

Analyse renaler Funktionen der cGMP- abhängigen Proteinkinase II

**(Analysis of renal functions of cGMP-dependent protein
kinase II)**



Dissertation

Zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften (Dr. rer.nat)
der Fakultät IV – Chemie und Pharmazie –
Lehrstuhl für Pharmakologie und Toxikologie
Universität Regensburg

vorgelegt von
Andrea Schramm
aus
Pegnitz
Im Jahr 2014

Dissertation eingereicht: März 2014

Die Arbeit wurde angeleitet von: Herrn Prof. Dr. rer. nat. Jens Schlossmann

Prüfungsausschuss:

Vorsitzender: Herr Prof. Dr. rer. nat. Sigurd Elz

1. Gutachter (1. Prüfer): Herr Prof. Dr. rer. nat. Jens Schlossmann

2. Gutachter (2. Prüfer): Herr Prof. Dr. med. Frank Schweda

3. Prüfer: Herr Prof. Dr. rer. nat. Joachim Wegener

Meiner Familie

*„The important thing is not to stop questioning;
curiosity has its own reason for existing.“*

Albert Einstein

Inhaltsverzeichnis

A.	EINLEITUNG	4
A.1	PROTEINREGULATION DURCH SECOND-MESSENGER UND KINASEN – DER cGMP-ABHÄNGIGE SIGNALWEG	4
A.1.1	cGMP-abhängige Proteinkinasen.....	7
A.1.1.1	Struktur	7
A.1.1.2	Lokalisation, Substrate und Funktionen	8
A.1.1.3	Das cGKII-KO-Mausmodell.....	10
A.1.2	Pharmakologische Beeinflussung des cGMP- Signalsystems.....	11
A.2	DIE NIERE	11
A.2.1	Funktion, Struktur und Aufbau	11
A.2.2	Urinaufkonzentrierung entlang des Nephrons.....	12
A.2.3	Die Regulation renaler Prozesse	14
A.2.4	Aquaporine	17
A.2.4.1	Regulation von AQP2	17
A.2.4.2	Pathophysiologische Defekte des Vasopressin/AQP2-Systems.....	19
A.2.4.3	Pharmakologische Beeinflussung des Vasopressin/AQP2-Systems.....	21
A.2.5	Der epitheliale Natriumkanal – Feinsteuerung der Natrium-Konzentrationen im Endharn	22
A.2.5.1	Regulation.....	23
A.2.5.2	Pathophysiologische Defekte des Aldosteron/ENaC-Systems.....	25
A.2.5.3	Pharmakologische Beeinflussung von ENaC.....	25
A.3	ZIELE UND FRAGESTELLUNG.....	27
B.	MATERIAL UND METHODEN.....	28
B.1	MATERIALIEN.....	28
B.1.1	Geräte	28
B.1.2	Chemikalien, Arzneistoffe, Verbrauchsmaterialien und Kits.....	28
B.1.3	Verwendete Antikörper für Western Blot (WB) und Immunhistochemie (IH).....	30
B.1.4	Puffer und Lösungen.....	31
B.1.5	Verwendete Futtermittel	32
B.2	METHODEN	32
B.2.1	Molekularbiologische Methoden	32
B.2.1.1	Polymerase-Ketten-Reaktion	32
B.2.1.2	Agarose-Gelelektrophorese	33
B.2.1.3	Klonierung.....	34
B.2.1.3.1	Restriktionsverdau und Ligation.....	35
B.2.1.3.2	Herstellung kompetenter Bakterien und Transformation	36
B.2.1.3.3	Gewinnung von Plasmid-DNA mittels Mini/Maxi-Prep und anschließende Sequenzierung.....	37
B.2.1.4	Protein-Expression in E.coli.....	37
B.2.2	Proteinbiochemische und immunologische Methoden.....	38
B.2.2.1	Aufreinigung von Protein mittels Ni-NTA-Affinitätschromatographie und Aufkonzentrierung.....	38

Inhaltsverzeichnis

B.2.2.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	39
B.2.2.3 Coomassie-Färbung	41
B.2.2.4 Western Blot	41
B.2.2.5 Immunisierung von Kaninchen	42
B.2.2.6 Gewinnung von Protein aus Mausgeweben und cGMP-Agarose-Fällung	43
B.2.2.7 Aufreinigung von Antikörpern mittels CNBr-Affinitätschromatographie und Depletion	43
B.2.2.8 Plasmamembranpräparation mittels differentieller Zentrifugation.....	44
B.2.2.9 Immunhistochemie und Mikroskopie	45
B.2.3 Tierexperimente und physiologische Versuche.....	47
B.2.3.1 Stoffwechsel-Versuche	47
B.2.3.2 Serum-Gewinnung	48
B.2.3.3 Retrograde Perfusion.....	48
B.2.3.4 Blutdruckmessung.....	49
B.2.3.5 Urin- und Serumanalyse	49
B.2.3.5.1 Kreatininbestimmung mittels HPLC	49
B.2.3.5.2 Bestimmung von Elektrolyten, Osmolalität und pH.....	50
B.2.3.5.3 Bestimmung von cGMP, Vasopressin und Aldosteron.....	51
B.2.4 Statistische Auswertung	51
B.2.5 Verwendete Software	52
C. ERGEBNISSE	53
C.1 HERSTELLUNG EINES SPEZIFISCHEN ANTIKÖRPERS GEGEN CGKII	53
C.1.1 Klonierung der N-terminalen Domäne der cGKII.....	53
C.1.2 Expression in E.coli BL21(DE3)pLysS.....	55
C.1.3 Protein-Aufreinigung mittels Ni-NTA- Affinitätschromatographie	56
C.1.4 Analyse der Finalseren.....	58
C.1.5 Antikörper-Aufreinigung und anschließende Depletion	59
C.2 ANALYSE BASALER RENALER FUNKTIONEN DER CGKII.....	60
C.2.1 Expression von cGKII in Cortex und Medulla.....	60
C.2.2 Basale Stoffwechsel-Daten	61
C.3 ANALYSE DER RENALEN FUNKTION DER CGKII UNTER FORCIERTEN PHYSIOLOGISCHEN BEDINGUNGEN....	64
C.3.1 Durstversuche.....	64
C.3.1.1 Urin-und Serum-Analytik	64
C.3.1.2 Immunhistochemische Analyse	65
C.3.2 Volumenexpansionsversuche	66
C.3.2.1 Vorversuch.....	66
C.3.2.2 Verabreichung einer isotonen Lösung (Volumenregulation).....	67
C.3.2.3 Verabreichung einer hypertonen Lösung (Osmoregulation, Salt Load).....	68
C.3.2.4 Verabreichung einer hypotonen Lösung (Osmoregulation, Water Load)	68
C.3.2.5 Analyse der Kalium-Molmengen	69
C.3.3 Detaillierte Analyse der Urin-Ausscheidung unter forcierter hypotoner Osmoregulation	70
C.3.3.1 Urin- Analyse	70

Inhaltsverzeichnis

C.3.3.2 Bestimmung des Blutdrucks.....	73
C.3.3.3 Untersuchung der cGMP-, Aldosteron- und Vasopressin- Spiegel	74
C.3.4 Untersuchung renaler Downstream-Effektoren der cGKII	75
C.3.4.1 ENaC	76
C.3.4.1.1 Qualitative und quantitative Analyse der Membranlokalisation mittels IHC und WB.....	76
C.3.4.1.2 Pharmakologische Beeinflussung mittels Amilorid.....	78
C.3.4.2 Aquaporin 2.....	79
C.3.4.2.1 Qualitative und quantitative Analyse der Membranlokalisation mittels IHC und WB.....	79
C.3.4.2.2 Untersuchung des Phosphorylierungs-Status von AQP2 an Ser256.....	81
D. DISKUSSION	83
D.1 DIE CGKII HAT KEINEN EINFLUSS AUF DIE BASALE WASSER- UND ELEKTROLYTAUSSCHIEDUNG	83
D.1.1 Die Nierenfunktion ist unter Renin-stimulatorischen und –inhibitorischen Bedingungen nicht beeinträchtigt	83
D.1.2 cGKII-KO-Tiere zeigen eine veränderte Kreatinin-Ausscheidung.....	84
D.2 DIE cGKII IST NICHT AN DER URIN-AUFKONZENTRIERUNG BETEILIGT.....	85
D.3 DIE BETEILIGUNG DES cGMP/CGKII-SIGNALSYSTEMS BEI DER FORCIERTEN URIN-VERDÜNNUNG	86
D.3.1 Die hypotone Volumenexpansion führt zur Steigerung der renalen cGMP-Synthese	87
D.3.2 Die hypotone Volumenexpansion hat keine Auswirkung auf die Vasopressin-Exkretion.....	89
D.3.3 Das Fehlen der cGKII führt bei forcierter Diurese zu einer veränderten Membranexpression von AQP2.....	90
D.3.4 Die cGKII ist nach hypotoner Volumenbelastung an der Ionenausscheidung beteiligt.....	94
D.3.4.1 Die hypotone Volumenexpansion führt zur Steigerung des Aldosteron-Spiegels und moduliert die ENaC-Expression.....	94
D.3.4.2 Mögliche Interaktionen mit weiteren Ionenkanälen	97
E. ZUSAMMENFASSUNG.....	99
F. SUMMARY	101
G. LITERATURVERZEICHNIS.....	103
H. ANHANG.....	121
H.1 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	121
H.2 ABBILDUNGSVERZEICHNIS	122
H.3 TABELLENVERZEICHNIS	123
H.4 WEITERE ANHÄNGE.....	124
H.4.1 Protokoll zum Gießen von LB-Agarplatten	124
H.4.2 PCR-Protokoll zur Genotypisierung von cGKII-KO-Mäusen.....	124
H.4.3 Verkürzte cGKII-DNA und Protein-Sequenz zur Expression in E.coli und Generierung eines Antikörpers.....	125
H.5 DANKSAGUNG	126
H.6 EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG	127

A. Einleitung

Der Mensch besteht als mehrzelliger, eukaryontischer Organismus nach neuesten Schätzungen aus $3,72 \times 10^{13}$ einzelnen Zellen, die im Körper ganz unterschiedliche Aufgaben erfüllen [20]. Die Entwicklung, welcher Zelle welche Spezialisierung widerfährt, wird mittels genetischer Prozesse gesteuert. Im adulten Zustand müssen Zellen in der Lage sein, auf Signale von außen, die von benachbarten Zellen oder von einer höheren Ebene, wie z.B. dem Gehirn und anderen endokrinen Organen aus gesendet werden, angemessen zu reagieren. Gerade in der Niere, dem komplex aufgebauten Exkretions-Organ von Vertebraten, ist es nötig, auf Umweltänderungen, wie beispielsweise Osmolaritätsänderungen des Blutes, schnell zu reagieren. Diese Arbeit beschäftigt sich mit Regulationsmechanismen von renalen Zellen, die von außen ankommende Signale innerhalb der Zelle weiterleiten. Für diese Signaltransduktion spielen insbesondere sekundäre Botenstoffe (Second Messenger) intrazellulär eine entscheidende Rolle. Ein wichtiger Second Messenger, dessen renale Signaltransduktion in dieser Arbeit näher betrachtet wurde, ist cGMP. Daher soll einleitend zunächst auf das Prinzip der Second-Messenger-Regulation mittels cGMP und dessen Regulatoren eingegangen werden. Nachfolgend werden renale Grundprinzipien, die in dieser Arbeit von besonderer Bedeutung waren, näher beleuchtet.

A.1 Proteinregulation durch Second-Messenger und Kinasen – der cGMP-abhängige Signalweg

Im Rahmen der Signaltransduktion werden Signale von außen, meist Hormone oder Peptidhormone, über einen Rezeptor zunächst ins Zellinnere weitergeleitet, wo anschließend verschiedene Effektoren eine Amplifizierung des Signals herbeiführen. Grundlegende Arbeiten bzgl. des hier vorgestellten cGMP-Signalwegs wurden bereits 1998 mit dem medizinischen Nobelpreis (Ignarro, Furchgott, Murad) geehrt. Ein zusammenfassendes Schema wird in Abb. 1 (S. 6) gezeigt.

Die Synthese von cGMP (zyklisches Guanosin-3'5'-Mono-Phosphat) wird einerseits ausgehend von Stickstoffmonoxid (NO) durch Aktivierung der löslichen Guanylat-Cyclase (cytosolischer NO-Rezeptor, soluble guanylate cyclase sGC) gesteigert. Neben NO führen natriuretische Peptide, Urodilatin und (Uro-)Guanylin ebenfalls zu einem Anstieg der intrazellulären cGMP-Spiegel. Diese kleinen Hormone (ca. 3kDa) bewirken unter anderem, wie der Name bereits vermuten lässt, eine starke Natrium-Ausscheidung [25], [112]. Neben ANP (atrial natriuretic peptide) gehören zu dieser Hormonklasse nach heutigem Kenntnisstand weiterhin BNP (brain NP), CNP (C-type NP), DNP (Dendroaspis NP), Urodilatin sowie Guanylin (GN) und Uroguanylin (UGN). Während ANP und BNP größtenteils kardialen Ursprungs sind (ANP: atriale Myocyten, BNP: ventrikuläre Myocyten, geringfügig auch aus anderen Organen wie dem Gehirn), wird CNP v.a. in Endothelzellen produziert (reviewed 2013 in [246]). Urodilatin hingegen wird renal durch Abspaltung aus dem ANP-Prä-Kursor-Peptid synthetisiert und luminal sezerniert. Die Ausschüttung von (Uro-)Guanylin erfolgt aus dem Gastrointestinaltrakt (GIT) [50], [118], [209].

DNP ist ein relativ neues Mitglied dieser Hormon-Familie und wurde zuerst aus dem Venom der grünen Mamba isoliert [210], die humane physiologische Relevanz ist strittig.

Der Rezeptor für diese Peptide ist nach heutigem Kenntnisstand ausschließlich ein Mitglied aus der Familie der partikulären Guanylat-Cyclasen (pGC bzw. Natriuretic Peptide Receptor NPR). Bislang sind 3 Isoformen dieser Enzyme beschrieben worden (NPR A, -B und -C): Während NPR-A eine hohe Affinität für die Bindung von ANP, BNP und Urodilatin aufweist, handelt es sich bei NPR-B um den Rezeptor für CNP [41], [208], [226]. NPR-C hingegen bindet neben (Uro-) Guanylin relativ unspezifisch auch alle weiteren natriuretischen Peptide und fungiert nach generell akzeptierter Meinung als Clearance-Rezeptor [71]. Funktionell erfolgt nach der Ligand-Rezeptor-Bindung intrazellulär die Katalyse der Synthese von cGMP aus GTP (Guanosin-5'-Tri-Phosphat). Da es sich bei den NPR-Isoformen um membranständige Proteine handelt und die hier untersuchte Kinase ebenfalls myristoyliert an der Membran verankert vorliegt (siehe unten), liegt die Vermutung nahe, dass der durch NPR generierte cGMP-Pool (im Gegensatz zu dem der sGC) verstärkt für die Aktivierung der cGKII zuständig ist (Zellkompartimentierung).

Für den second messenger cGMP sind bis heute drei verschiedene Effektoren beschrieben worden: durch cyclische Nucleotide gesteuerte Ionenkanäle (CNG-Kanäle), Phosphodiesterasen (PDEs) und cGMP-abhängige Proteinkinasen (cGKs). CNG-Kanäle spielen eine wichtige Rolle bei der Regulation von Ca^{2+} -abhängigen Prozessen im Rahmen der Signalweiterleitung von olfaktorischen und visuellen Neuronen [22]. PDEs (bislang 21 beschriebene Isoformen in 11 Familien; Review in [54]) katalysieren die Hydrolyse von cGMP und cAMP durch Ringöffnung des zyklischen Phosphat-Esters am 3'-Ende zu GMP und AMP und führen damit zu einer intrazellulären Verminderung der cGMP- bzw. cAMP-Konzentrationen. Auf Ebene der Phosphodiesterasen findet auch der hauptsächliche Cross-Talk zwischen cAMP- und cGMP-gesteuerten Signaltransduktionsprozessen statt, da durch die cGMP-induzierte Hemmung von PDEs der cAMP-Spiegel direkt beeinflusst werden kann [15], [222]. Unter Anderem haben diese Enzyme deshalb auch therapeutisch einen hohen Stellenwert (s. S.11). Neben der pharmakologisch wichtigen PDE5 [81] sind renal als cGMP-abbauende PDEs v.a. die Familien 1, 9 und 11 exprimiert [134].

Die dritte cGMP-Effektorklasse, die cGMP-abhängigen Proteinkinasen, soll im folgenden Abschnitt näher vorgestellt werden.

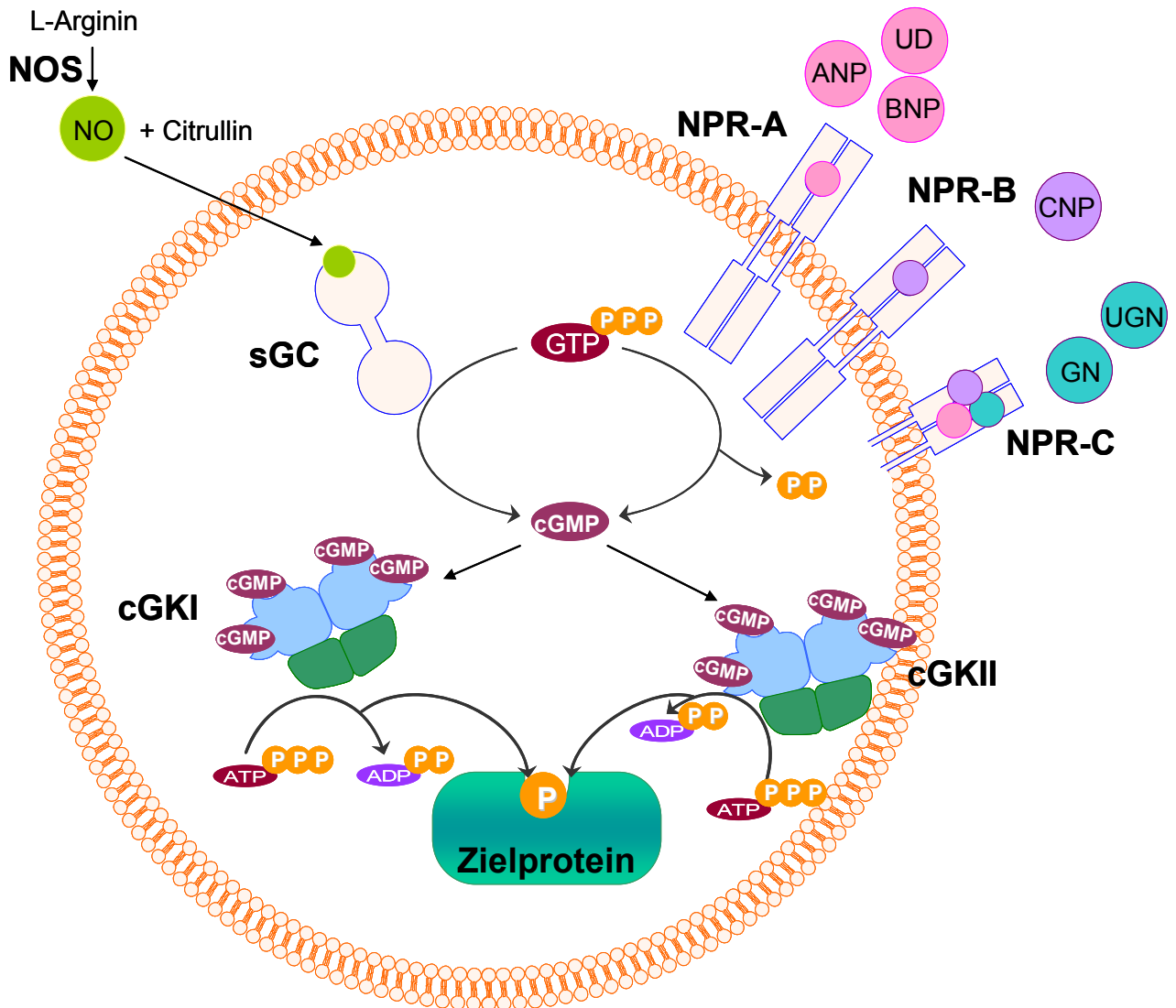


Abb. 1: Der NP/NO/cGMP-Signaltransduktionsweg

Die cGMP-Synthese ausgehend von GTP erfolgt mittels Katalyse durch partikuläre Guanylat-Cyclasen (NPR-A, -B, -C) nach Aktivierung durch natriuretische Peptide (ANP, BNP, CNP), Urodilatin (UD) oder Guanylin bzw. Uroguanylin (GN, UGN). Ferner wird die cGMP-Synthese auch NO-induziert unter Beteiligung der löslichen Guanylat-Cyclase (sGC) gesteigert (NOS = NO-Synthase). cGMP stimuliert schließlich die cGMP-abhängigen Proteinkinasen (cGKI bzw. cGKII), welche nachfolgend verschiedene Zielproteine phosphorylieren. Weiterhin werden durch cGMP weitere Effektoren (Phosphodiesterasen und CNG-Kanäle) aktiviert (nicht gezeigt). Weitere Erklärungen siehe Text.

A.1.1 cGMP-abhängige Proteinkinasen

Kinasen sind eine Klasse von Enzymen, welche in der Zelle als molekulare Schalter agieren. Sie katalysieren die Übertragung von Phosphatgruppen vom Donor-Molekül ATP auf die Seitenketten-Hydroxylgruppen verschiedener Aminosäuren von bestimmten Zielproteinen. Bei den cGMP-abhängigen Proteinkinasen, welche zur Klasse der Serin/Threonin-Kinasen gehören, handelt es sich um die Haupteffektor-Proteine für cGMP [173]. Im eukaryontischen Genom wurden bislang 2 cGK-codierende Gene aufgeklärt: Die Transkription von *prkg1* bewirkt die mRNA-Expression der cGKI, welche im nachfolgenden Translationsprozess durch alternatives Spleißen in zwei unterschiedlichen Isoformen exprimiert wird (cGKI α und cGKI β). Beide Isoformen sind im zellulären Cytoplasma lokalisiert [254]. Im Gegensatz dazu codiert *prkg2* eine eigenständige Form dieser cGMP-Effektor-Proteine, die cGKII. Dieses Protein liegt N-terminal an Aminosäure G2 myristoyliert an der Plasmamembran verankert vor [239].

A.1.1.1 Struktur

Bei cGMP-abhängigen Proteinkinasen handelt es sich um Homodimere mit einem Monomer-Molekulargewicht von 76-78kDa (cGKI, [98]) bzw. 87kDa (cGKII, [106]). Abb. 2 veranschaulicht schematisch deren stabähnliche Struktur, welche wie folgt untergliedert werden kann:

- 1) C-terminale katalytische Untereinheit: Diese weist eine ATP- sowie eine Substrat-Bindungsstelle auf, so dass die beiden Reaktions-Edukte in räumliche Nähe gebracht werden.
- 2) regulatorische Untereinheit: Hier findet die Bindung des Effektors cGMP statt, sie besteht aus 2 unterschiedlich affinen Tandem-Bindungsstellen für cGMP (hoch affin: cGMP A, niedrig affin: cGMP B). Eine Besetzung beider Bindestellen führt zu einer Konformationsänderung der Sekundär-Struktur, welche nachfolgend den Reaktionssubstraten einen freien Zugang zum katalytischen Zentrum ermöglicht. Die Aktivierung der Enzyme erfolgt durch eine cGMP-Konzentration im nano- bis mikromolaren Bereich [117], [136], [190].
- 3) N-terminale Untereinheit: Im N-terminalen Bereich finden sich nicht nur die größten strukturellen Unterschiede zwischen den drei cGK-Isoformen, die aminoternale Region übernimmt funktionell gleichzeitig verschiedene Aufgaben. Zum einen werden hier mittels eines Leucin-Zipper-Motivs die Homomere dimerisiert und Bindungen mit cGMP-Kinase-Anker-Proteinen (GKAPs) vermittelt. Weiterhin wird N-terminal eine autoinhibitorische Domäne exprimiert. Diese ist in ihrer Sequenz substratähnlich (Pseudosubstrat-Domäne) und vermittelt bei Abwesenheit von cGMP die Hemmung der Phosphotransferase-Aktivität. Innerhalb dieser Domäne befinden sich verschiedene Autophosphorylierungs-Stellen, deren Phosphorylierung eine Steigerung der basalen Kinase-Aktivität bewirkt. Schließlich ist der N-terminale Bereich verantwortlich für das sog. Targeting, also die Zielsteuerung der Kinasen innerhalb der Zelle. Hierdurch wird möglich, dass die

Isoformen zellulär unterschiedlich kompartimentiert werden und somit mit unterschiedlichen Substratproteinen interagieren können.[38], [76], [117], [191], [241].

Die meisten Strukturuntersuchungen wurden an der cGKI durchgeführt, jedoch ist aufgrund der hohen Sequenzhomologie anzunehmen, dass der strukturelle Aufbau der cGKII sehr ähnlich ausfällt.

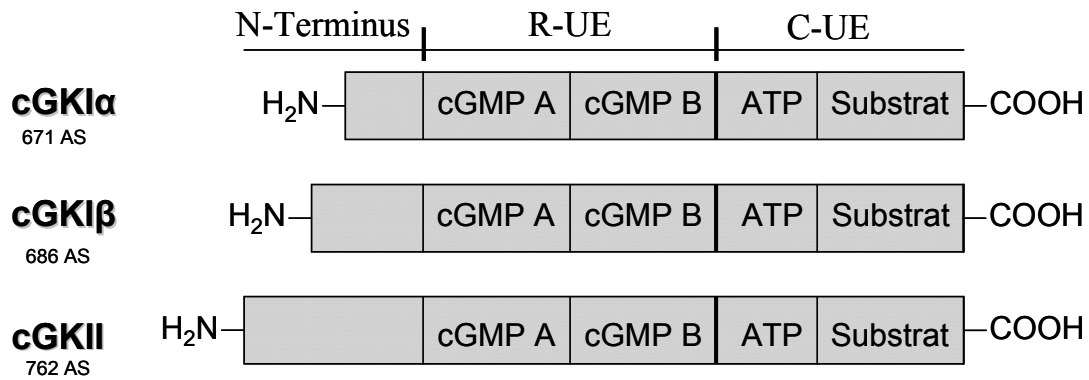


Abb. 2: Schematische Darstellung der Struktur der cGKs

Die Enzyme bestehen aus einem amino-terminalen Bereich, einer regulatorischen Untereinheit (R-UE) mit zwei cGMP-Bindungsstellen (cGMP A/cGMP B) und einer katalytischen Untereinheit (C-UE) mit der ATP- und der Substratbindungsstelle sowie einer anschließenden carboxy-terminalen Domäne. Die (Iso)formen unterscheiden sich hinsichtlich der Struktur v.a. durch einen variablen Aminoterminus. Weitere Erklärungen siehe Text.

A.1.1.2 Lokalisation, Substrate und Funktionen

Über lange Jahre hinweg waren die cGKI-Isoformen ein Forschungsschwerpunkt im Bereich der cGMP-abhängigen Signaltransduktion, so dass diesbezüglich viele gut fundierte Kenntnisse vorliegen. cGKIα bzw. β sind in Herz, Lunge, Niere, nervalen (Spinalganglien und Kleinhirn) und glattmuskulären Strukturen (Uterus, Blutgefäß-System, Intestinum und Trachea) sowie in Thrombozyten exprimiert und vermitteln dort diverse Funktionen (reviewed 2013 in [98]). Der Erforschung renaler cGMP-abhängiger Prozesse wurde in letzter Zeit mehr und mehr Bedeutung zugemessen; so konnte kürzlich eine cGKIα-abhängige, RhoA/ROCK-vermittelte Hemmung der interstitiellen Fibrose gezeigt werden [202].

Gegenüber der cGKI erfolgt die cGKII-Expression in diversen Gehirn-Bereichen, in Chondrozyten, sowie in renalem, pulmonalem und intestinalem Gewebe [98].

Funktionell war bereits die Rolle der cGKII in einigen dieser Organe mehr oder weniger intensiv Gegenstand der Forschung. Beim erst-entdeckten Substratprotein der cGKII handelt es sich um den „Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator“ (CFTR), einen Chloridkanal im sekretorischen Epithel verschiedener Organe wie z.B. dem Jejunum oder der Lunge. Die Phosphorylierung dieses Kanals soll eine Steigerung der Chlorid- und Wasser-Sekretion in das jejunale Lumen bzw. den alveolären Mukus bewirken [69], [82], [174], [240]. Weiterhin wurde

gezeigt, dass die cGKII die Natrium-Absorption im Dünndarm steigern konnte [40], [238]. Dies wird möglich durch Hemmung eines Na^+/H^+ -Antiporters (Na/H-Exchanger 3, NHE3). Da dieses Protein ebenfalls renal exprimiert ist, wird es später nochmals kurz eingehender betrachtet. Die gastrointestinale, sekretorische Funktion der cGKII lieferte einen ersten Hinweis, dass diese Kinase auch bei exkretorischen Prozessen in der Niere eine Rolle spielen könnte.

Gut erforscht ist inzwischen eine Funktion, die den Knochenaufbau betrifft. Eine Defizienz der cGKII führt in der phänotypischen Ausprägung zu Kleinwuchs (siehe auch Abb. 3). Es wurde gezeigt, dass Sox9 ein spezifisches Phosphorylierungstarget dieser Kinase darstellt. Bei Sox9 handelt es sich um einen Transkriptionsfaktor, der in Chondrozyten zu einer Hemmung der hypertrophischen Differenzierung führt. Die Phosphorylierung dieses Faktors bewirkt, dass der Chondrozyt sein genetisches Programm von Proliferation zu Ausdifferenzierung umschaltet [45], [174]. Neuere Arbeiten deuten auf mögliche therapeutische Funktionen der cGKII in Tumorgeweben hin. In Zellkultur wurde gezeigt, dass die Kinase durch Interaktion mit Sox9 bei Proliferationsprozessen eine hemmende Rolle spielen könnte [227].

Weiterhin wurde innerhalb der letzten Jahre eine funktionelle Studie, kombiniert mit einer detaillierten Analyse der Expression dieser Kinase in verschiedenen Bereichen des Gehirns, veröffentlicht. Hier konnte ein CNG-Kanal (HCN2), der sowohl Natrium als auch Kaliumionen leitet und als Schrittmacher-Leckstrom v.a. im Herzen und bei Neuronen eine wichtige Rolle spielt, als spezifisches cGKII-Substrat identifiziert werden (siehe auch Tab. 1) [89]. Die direkte Bindung von cGMP an diesen Kanal wirkt inhibitorisch, die Hemmung wird durch die cGKII-vermittelte Phosphorylierung noch potenziert. Im Gehirn konnte weiterhin eine cGK-gesteuerte Beeinflussung des „Angst-Verhaltens“ sowie des „Angst-Gedächtnisses“ gezeigt werden [170], [253]. Außerdem wird für die cGKII eine Wechselwirkung mit Regulationsproteinen der circadianen Rhythmik diskutiert [103], [167], auch die cGKI soll hierbei beteiligt sein [184].

Die renale Expression der cGKII entlang des Nephrons und deren funktionelle Implikationen werden nach Einführung des Begriffs (siehe S.11) nochmals genauer aufgegriffen.

Im Gegensatz zur cGKI (von deren Isoformen inzwischen über zehn Zielproteine detektiert werden konnten, u.A. IRAG, VASP und ROCK; reviewed 2013 in [98]) steht die relativ geringe Anzahl der gesicherten Effektorproteine der cGKII (siehe Tab. 1). Diese Arbeit setzte sich deshalb, u.a. mithilfe von *in vivo* Untersuchungen an KO-Mäusen, ausführlich mit renalen Funktionen der Kinase sowie möglichen renalen Interaktionspartnern auseinander.

Protein	Lokalisation	Funktion
CFTR	sekretorische Epithelien	Chlorid-Transporter
SOX9	Chondrozyten	Transkriptionsfaktor
HCN2	cerebrale und cardiale Schrittmacher-Zellen	CNG-Kanal

Tab. 1: Phosphorylierungs-Targets der cGMP-abh. Proteinkinase II

A.1.1.3 Das cGKII-KO-Mausmodell

Für die funktionelle Analyse der cGKII in renalem Gewebe sind Knockout-Mäuse (KO) ein unverzichtbares Mittel. Mitte der 90er Jahre wurde die cGKII-KO-Maus von A.Pfeifer mittels Gene-Targeting generiert und phänotypisch charakterisiert [174]. Hierbei wurden ein Teil von Exon 2 sowie der Übergang zum nächsten Intron deletiert, so dass die Translation im Organismus bereits N-terminal gestoppt und die Expression eines funktionellen Proteins vollständig unterbunden wird. Wie Abb. 3 illustriert, sind die augenscheinlichsten phänotypischen Merkmale dieser Deletion die geringe Körpergröße sowie die gedrungene Körperform (cGKII-abh. Phosphorylierung von Sox9, siehe oben). Weiterhin wurden bislang nur Störungen der Regulation der in Tab. 1 angegebenen Proteine (Erklärungen siehe obiger Abschnitt) aufgeklärt. Der Phänotyp der cGKII-KO-Tiere fällt hiermit relativ mild aus. Defizite in der Embryonalentwicklung konnten ausgeschlossen werden, da die Tiere eine normale Fertilität aufweisen. Auch Organgröße, Serumelektrolyte, Knochendichte und Körperfettanteil verhielten sich nicht unterschiedlich zum Wildtyp (WT) [174]. In Kontrast dazu steht der Phänotyp von cGKI-KO-Tieren, bei welchen die Gen-Deletion schwere Konsequenzen hervorruft (u.a. schwere vaskuläre und intestinale Defekte, stark reduzierte Lebenserwartung [172]), weshalb sich die Grundlagen- sowie auch die Arzneimittelforschung zunächst hauptsächlich auf diese Isoform fokussierte.



Abb. 3: Phänotypische Ausprägung einer genetischen Deletion der cGKII

A.1.2 Pharmakologische Beeinflussung des cGMP- Signalsystems

Auf dem Arzneimittelmarkt findet sich mittlerweile eine ganze Reihe an Pharmaka, welche auf die cGMP-Signalkaskade einwirken, u.a. werden NO-Donoren zur Anfallsprophylaxe bei Angina pectoris eingesetzt. Derzeit befindet sich ein weiterer, NO-unabhängiger sGC-Stimulator in der klinischen Prüfung und Zulassung (Riociguat), dieser soll therapeutisch zur Behandlung von pulmonaler arterieller Hypertonie eingesetzt werden [79].

Neben der Verstärkung der cGMP-Synthese stellte sich die Generierung eines erhöhten intrazellulären cGMP-Spiegels durch die Hemmung von Phosphodiesterasen (siehe S.5) als effizienter und lukrativer Weg heraus. 1998 erhielt Viagra® die klinische Zulassung zur Behandlung der erektilen Dysfunktion des Mannes. Der enthaltene Wirkstoff Sildenafil bewirkt intrazellulär durch Inhibition der cGMP-spezifischen PDE5-Aktivität einen Anstieg des cGMP-Spiegels. Neuere Untersuchungen deuten auf mögliche Indikationen von weiteren PDE-Hemmstoffen hin, wie z.B. Morbus Parkinson oder Schizophrenie [77].

Seit Ende 2012 ist auf dem US-amerikanischen und Schweizer Markt das Medikament Constella® zugelassen, indiziert bei Reizdarmsyndrom und möglicherweise mit klinischem Potential bei Colitis ulcerosa [44], [175]. Bei dem darin enthaltenen verdauungsfördernden und lokal schmerzlindernden Wirkstoff (Linaclotid) handelt es sich um einen spezifischen NPR-C-Agonisten. Durch kompetitive Hemmung des Clearance-Kanals werden NPR-A bzw. NPR-B verstärkt aktiviert (lokal erhöhte NP-Konzentrationen). Die gesteigerte membrangebundene cGMP-Synthese aktiviert die cGKII, was letztlich zu einer Aktivierung des CFTR-Kanals und damit zu einer erhöhten Chlorid-Sekretion führt.

Obwohl mehrere direkte cGK-Inhibitoren beschrieben wurden (reviewed in [259]), ist deren pharmakologischer Nutzen zur Zeit noch kaum erforscht.

A.2 Die Niere

A.2.1 Funktion, Struktur und Aufbau

Die Niere übernimmt als Exkretionsorgan der Vertebraten diverse Funktionen, neben anderen v.a. die Ausscheidung harnpflichtiger Substanzen, die Regulation des Wasser- und Elektrolythaushalts sowie die pH-Einstellung im Organismus. Strukturell wird dieses Organ in einen stark durchbluteten Rinden- (Cortex) und einen schwächer durchbluteten Mark-Bereich (Medulla) unterteilt, wobei sich der medulläre Abschnitt nochmals in innere (IM) und äußere Medulla (OM, outer medulla, nochmals unterteilbar in innerer und äußerer Streifen) gliedern lässt (vgl. auch Abb. 4, S. 14). Bei der kleinsten, funktionell-histologischen Einheit der Niere handelt es sich um das Nephron, welches aus dem Corpusculum renale (gebildet aus Glomerulus und Bowman'scher Kapsel), dem Tubulus-System und dem abführenden Sammelrohr besteht. Im cortical gelegenen Nierenkörperchen findet die Ultrafiltration statt: Ausgehend von der Arteria renalis verzweigt sich das blutzuführende Arteriensystem immer feiner, bis es schließlich als Vasa afferentia den Blutstrom verschiedenen Glomeruli zuführt. Hierbei handelt es sich um ein

dichtes Knäuel finer Kapillarschlingen, deren gefenstertes, stark negativ geladenes Endothel einen Übertritt von Wasser, Ionen und ladungsselektiv auch Molekülen mit einem max. Molekulargewicht von ca. 50-70kDa aus dem Kapillarlumen in den intraluminalen Raum der Bowman'schen Kapsel erlaubt. Eine weitere Zellschicht (Podozyten) liegt dem Kapillarendothel direkt an (verschmolzene Basallaminae) und bildet die größte Barriere des Siebfilters. Ferner liegen zwischen den Kapillarschlingen weiterhin sog. Mesangialzellen, welchen unterschiedliche Funktionen, u.a. phagozytotische Prozesse zugeschrieben werden. Nach Passage des glomerulären Filters wird das Blut über die Vasa efferentia wieder aus dem Glomerulus abgeführt, zur Versorgung des Nierenparenchyms in das Organinnere weitergeleitet und fließt schließlich im venösen Blutstrom ab. Das Ultrafiltrat hingegen strömt aus dem Lumen der Bowman'schen Kapsel in das Tubulus-System des jeweiligen Nephrons. Dieses gliedert sich in einen proximalen Abschnitt, die in die Markzone absteigende Henle'sche Schleife sowie einen distalen Abschnitt, welcher cortical schließlich im Sammelrohr endet. Annähernd 3000 Tubuli benachbarter Nephrene münden in jeweils ein Sammelrohr, diese durchziehen die Niere bis zur Papille, wo der Harn letztlich im trichterförmigen Teil des Harnleiters (Nierenbecken) aufgefangen und über den Harnleiter (Ureter) zur Blase abtransportiert wird [204].

Alle drei Rezeptorsubtypen des Natriuretischen-Peptid-Systems (NPR-A, -B und -C) sind in der Niere exprimiert. NPR-A kommt mit seiner ubiquitären Verteilung entlang des gesamten Nephrons wohl neben NPR-C (exprimiert entlang verschiedener Nephronsegmente einschließlich proximaler Tubuluszellen und dem Sammelrohr) renal die größte Bedeutung zu [66], [126], [216]. Während für die cGKI-Isoformen seit Kurzem eine detaillierte renale Analyse der sub-strukturellen Protein-Verteilung vorliegt [202], konnte mangels entsprechender spezifischer Antikörper bislang lediglich die mRNA-Expression der cGKI entlang des Nephrons gesichert gezeigt werden. Diese wurde hauptsächlich in corticalen Bereichen sowie hochkonzentriert in der Papille nachgewiesen, eine geringe mRNA-Expression konnte auch in der äußeren Medulla detektiert werden. Mittels Mikrodisektion wurden die verschiedenen Nephron-Abschnitte näher analysiert, hier wurde v.a. eine Anreicherung in afferenten Arteriolen (Juxtaglomerulärer Apparat, siehe unten), im aufsteigenden Ast der Henle-Schleife sowie geringfügig auch im Bürstensaumepithel des proximalen Tubulus gezeigt, während im distalen Tubulus sowie im Sammelrohr keine Expression der cGKI nachgewiesen werden konnte [74]. Da diese Studien mittlerweile fast 20 Jahre zurückliegen, sollte jedoch auf die limitierte Methodik hingewiesen werden, so dass die Expression dieses Proteins nicht auf die gezeigten Nephron-Abschnitte beschränkt sein muss.

A.2.2 Urinaufkonzentrierung entlang des Nephrons

Im Rahmen der glomerulären Filtration werden täglich zw. 150 und 180l Primärharn gebildet. Zahlreiche Transportprozesse entlang des Nephrons führen zu einer starken Aufkonzentrierung des Ultrafiltrats, so dass letztlich bei einer normalen Flüssigkeitszufuhr gerade einmal 1-1,5l Urin ausgeschieden werden. Hierbei ist die menschliche Niere in der Lage, den Endurin maximal auf die vierfache Plasmaosmolarität aufzukonzentrieren (1200mosmol/kg H₂O), der

Modellorganismus Maus ist sogar befähigt, Urin mit einer Osmolarität bis zu 4000 mosmol/kg H₂O auszuscheiden [196]. Möglich wird dies durch komplexe Mechanismen, deren Grundlage ein osmotischer Gradient innerhalb der Niere darstellt. Dieser steigt cortical zu medullär an; während im Cortex eine isotone Osmolarität zum Blutplasma vorherrscht, besitzt die Papillenspitze eine ähnliche Osmolarität wie aufkonzentrierter Urin [121]. Der proximale Tubulus weist mit seinem Bürstensaumepithel eine enorme Oberflächenvergrößerung auf, wodurch eine intensive Rückresorption der im Glomerulum filtrierten Substanzen gewährleistet ist. In diesem Nephronabschnitt werden bereits 60% des filtrierten Natriums, eines der Hauptionen, welches für die Einstellung von osmotischen Gradienten notwendig ist, rückresorbiert. Die treibende Kraft hierzu ist, wie auch in sämtlichen anderen Nephron-Abschnitten, ein elektrochemischer Gradient zwischen dem Cytoplasma der Epithelzellen und dem Tubuluslumen, welcher durch die basolateral exprimierte Na-K-ATPase aufgebaut wird. Auf apikaler Seite gelangen Natrium-Ionen erstrangig über den Natrium/Protonen-Austauscher NHE3 elektrochemisch neutral aus dem Tubuluslumen in die Zelle. Eine cGMP-abhängige Beeinflussung dieses auch intestinal exprimierten Transporters wird v.a. im Ileum schon seit längerem diskutiert. Vor kurzem konnte weiterhin eine Uroguanylin-induzierte Steigerung der cAMP- und cGMP-Spiegel in renalen LLC-PK₁-Zellen gezeigt werden, welche PKA/PKG-abhängig eine Verminderung der NHE3-Transportaktivität bewirkte [137]. Zumindest bei intestinal exprimiertem NHE3 scheint für die cGMP/cGK-vermittelte Regulation ein Ankerprotein nötig zu sein (NHERF2), in Co-Transfektionen wurde eine Interaktion zwischen NHERF2 und der myristoylierten Form der cGKII nachgewiesen [40]. In neueren Untersuchungen konnte in Präparationen des distalen Ileums von Wildtyp-Tieren nach Gabe von STa (ein E.coli-Toxin, welches an GC-C bindet und die intrazellulären cGMP-Spiegel erhöht) eine signifikante Hemmung der NHE3-Aktivität gezeigt werden. In NHERF2-KO-Präparationen hingegen wurde dieser Effekt nicht mehr beobachtet [156].

Der proximale Tubulus weist starke Transportkapazitäten auf, baut jedoch keinen hohen osmotischen Gradienten auf, da mittels spezifischer Wasserkanäle (Aquaporine, siehe unten) eine gute Wasserdurchlässigkeit gewährleistet ist und somit sowohl Ionen als auch Wasser isoton rückresorbiert werden [204]. Von eminenter Bedeutung für die Produktion eines konzentrierten Urins sind die medullär gelegenen Henle'schen Schleifen. Der dicke aufsteigende Ast ist wasserundurchlässig, jedoch findet hier eine aktive, hauptsächlich durch Natrium-Kalium-2Chlorid-Symporter (NKCC2, siehe unten) gesteuerte Ionenrückresorption statt, wodurch die Osmolarität des Interstitiums zunimmt. Nach dem Prinzip der Gegenstrom-Multiplikation wird dem wasserundurchlässigen absteigenden Teil der Henle-Schleife hierdurch osmotisch Wasser entzogen [204]. Bis zum Ende der Henle'schen Schleifen hat bereits ein Großteil der Elektrolyt- und Wasser-Reabsorptionsprozesse stattgefunden, die distalen Tubuli sowie die Sammelrohre dienen der Feineinstellung der Urin-Osmolarität. Während die Reabsorption in den vorangeschalteten Nephron-Abschnitten hauptsächlich von der Flussgeschwindigkeit der Tubulus-Flüssigkeit abhängt, welche durch die glomeruläre Filtrationsrate (GFR) bestimmt wird,

kann diese im distalen Nephron sowie im Sammelrohr hormonell gesteuert werden. So wird eine renale Adaption an Volumenbelastungen des Organismus oder Osmolaritätsänderungen des Blutplasmas möglich.

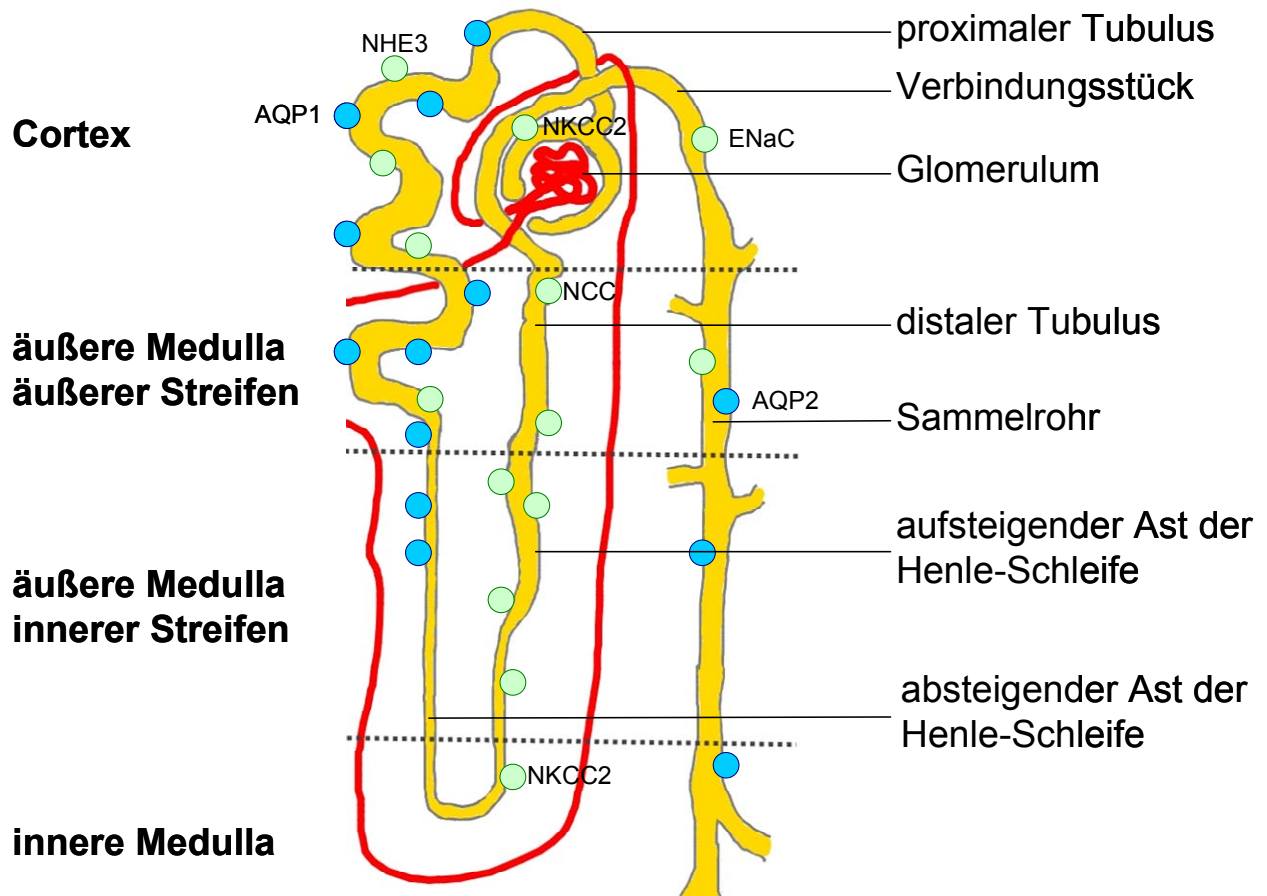


Abb. 4: Schematische Darstellung eines Nephrons

Dargestellt ist ein schematisches Nephron mit stark vereinfachter begleitender Vaskulatur sowie den wichtigsten Wasser- (blaue Kreise) sowie Natrium- Transportprozessen (grüne Kreise). Weitere Erklärungen siehe Text.

A.2.3 Die Regulation renaler Prozesse

Die Effektivität der Elektrolyt-Reabsorption entlang des Nephrons wird in erster Linie durch die Geschwindigkeit, mit der das Blut die glomerulären Filter passiert, determiniert (GFR). Um diese trotz Blutdruckschwankungen konstant zu halten, verfügt die Niere über verschiedene Autoregulationsmechanismen. Neben der myogenen Autoregulation sind hierbei v.a. das tubuloglomeruläre Feedback (TGF) sowie die Regulation über das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS) beteiligt. Im Rahmen des TGFs wird durch osmosensorische Zellen der Macula densa mithilfe des NKCC2-Symporters kontinuierlich die intraluminale NaCl-Konzentration bestimmt. Ist diese erhöht, führt eine Vasokonstriktion des Vas afferens zu einer Verminderung der GFR und damit zu einer Down-Regulierung der Flussgeschwindigkeit des Ultrafiltrats [204]. Eine Beeinflussung des TGFs durch cGMP wird seit Längerem diskutiert. In vitro konnte kürzlich

eine Hemmung des depolarisationsinduzierten TGFs mittels cGMP gezeigt werden [183]; mechanistische Untersuchungen deuten auf eine Phosphodiesterasen-vermittelte Abnahme der NKCC2-Oberflächenexpression hin [7]. Ob die Regulation dieses Feedback-Mechanismus auch cGMP-abhängige Proteinkinasen umfasst, ist bislang unklar.

Ein Blutdruckabfall führt zur Aktivierung des RAAS-Systems, wodurch einerseits eine Vasokonstriktion der Vasa efferentia, und damit eine verminderte Abflussgeschwindigkeit des glomerulären Blutstroms zur Konstanthaltung der GFR, sowie andererseits ein Anstieg der renalen Natrium-Reabsorption bewirkt wird. Eine inhibitorische Funktion von cGMP bei der Renin-Sekretion aus Zellen des juxtaglomerulären Apparates (JGA) wurde bereits vor längerer Zeit gezeigt [94], [205]. Die Co-Lokalisation der cGKII mit Speichergranula innerhalb von juxtaglomerulären Zellen sowie ein Anstieg der Renin-Sekretion in cGKII-KO-Mäusen deuten auf eine Funktion dieser cGMP-Kinase-Isoform hin [74], [248], allerdings wurde 2013 auch eine starke Expression der cGKI α in reninbildenden Zellen nachgewiesen [202]. Interessanterweise wird die Renin-Sekretion durch NO/cGMP gesteigert, indem die PDE3-vermittelte cAMP-Hydrolyse gehemmt wird [130], so dass wohl von einer dualen Rolle von cGMP bezüglich der Renin-Freisetzung ausgegangen werden muss.

Weiterhin spielt die sympathische Innervation der Niere bei der Regulation der Nierentätigkeit eine wichtige Rolle. Durch erhöhte efferente Nervenimpulse werden über spezifische Adrenorezeptoren sowohl der renale Blutfluss als auch die GFR vermindert, sowie die tubuläre Natrium- und Wasser-Reabsorption und die Renin-Freisetzung gesteigert. Afferente Nerven sind bei der Kommunikation beider Nieren von Bedeutung (renorener Reflex), um eine gleichmäßige Regulation der Salz- und Wasserbalance zu gewährleisten [109].

Schließlich unterliegt die Nierenfunktion auch der endokrinen Kontrolle. Eine Reihe von Hormonen nimmt Einfluss auf die renale Wasser- und Elektrolytreabsorption bzw. -sekretion. Während eine Beeinflussung des renalen Blutflusses bzw. der GFR, wie z.B. durch NO, Auswirkungen auf sämtliche Transportprozesse entlang des gesamten Nephrons hat, wirken einige Hormone lokaler an bestimmten Transportern und Kanälen. Im Rahmen dieser Arbeit waren besonders Aldosteron und Vasopressin (antidiuretisches Hormon, ADH) von Bedeutung. Beide Hormone entfalten ihre Wirkung in distalen Nephronabschnitten bzw. im Sammelrohr. Das Mineralcorticoid Aldosteron wird als Teil des RAAS nach Angiotensin II-Stimulation aus der Zona glomerulosa der Nebennierenrinde freigesetzt und führt renal hauptsächlich zur Aktivierung des epithelialen Natriumkanals (ENaC, siehe unten), was eine verstärkte Natrium-Rückresorption zur Folge hat [204]. Ein Einfluss der cGKII auf die Aldosteronsekretion aus Zona glomerulosa-Zellen der Nebennierenrinde wird diskutiert. Die Expression dieses Enzyms wurde in der Nebennierenrinde von Ratten gezeigt; weiterhin konnte nach cGKII-Überexpression in Zellkultur ein Anstieg der Aldosteron-Produktion beobachtet werden [75]. Im Gegensatz dazu wurde dieser Effekt anhand von cGKII-defizienten Tieren in vivo nicht belegt [223], weshalb die Bedeutung der cGMP-abhängigen Proteinkinase II in Bezug auf die Aldosteron-Freisetzung weiterhin strittig bleibt.

Vasopressin ist ein wichtiges Hormon im Rahmen der Osmoregulation und wird als Folge einer gesteigerten Blutosmolarität aus dem Hypophysenhinterlappen sezerniert. Die Signalkaskade, die letztlich renal zu einer starken Antidiurese führt, ist inzwischen gut aufgeklärt (vgl. auch S. 17 bzw. Abb. 5) [34], [72]. Die Bindung von Vasopressin an V_2 -Rezeptoren führt intrazellulär zur Aktivierung der Proteinkinase A, durch Phosphorylierung bestimmter Wasserkanäle (Aquaporine, siehe unten) wird letztlich ein verstärkter luminaler Membraneinbau derselben erzielt, wodurch im an sich wasserundurchlässigen Sammelrohr die Wasserpermeabilität ermöglicht wird [131]. Seit Ende der 1980er Jahre ist bekannt, dass ANP die Vasopressin-Freisetzung aus dem Hypophysenhinterlappen unter verschiedenen physiologischen Bedingungen hemmen kann [2], [194], [257]. Eine neuere Studie im Menschen konnte die Hemmung der mit Angiotensin II vorstimulierten Vasopressin-Sekretion durch ANP nochmals bestätigen [148].

Während also Vasopressin aufgrund einer erhöhten Plasma-Osmolarität (bzw. aufgrund von Hypovolämie [11]) ausgeschüttet wird, fungieren die natriuretischen Peptide als natürlicher Gegenspieler; sie bewirken eine gesteigerte Natriurese und Diurese als Antwort auf Hypervolämie (Volumenregulation). Neben der Hemmung der Vasopressin-Freisetzung wirken natriuretische Peptide auf endokriner Ebene inhibitorisch auf das RAAS sowie auf Endothelin [39]. ANP wird aus den kardialen Atrien hauptsächlich als Folge einer gesteigerten kardialen Wandspannung sezerniert (weitere Faktoren wie neurohumorale oder physiologische Stimuli werden diskutiert) [215]. Obgleich erste Untersuchungen noch darauf hinwiesen, dass ANP den renalen Haupteffektor aus der Gruppe der natriuretischen Peptide darstellt, gilt diese Vorstellung heute als überholt [129]. Vielmehr rücken Urodilatin, GN und UGN als primäre Messenger mehr und mehr in den Mittelpunkt der renalen cGMP-Forschung, sie stimulieren u.a. die renale Natriurese, Kaliurese und Diurese [66], [216]. Nichtsdestotrotz bewirken ANP und CNP einen Anstieg der cGMP-Konzentration in Podozyten [138]. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass niedrige ANP-Konzentrationen (10nM) im Glomerulum und IMCD zu einem Anstieg der cGMP-Konzentration führen, wohingegen selbst mit 10fach höher potenziert ANP-Konzentration in keinem weiteren Nephronabschnitt ein Anstieg der cGMP-Konzentration beobachtet werden konnte [116]. Generelle renale Wirkungen der natriuretischen Peptide umfassen eine Steigerung der GFR durch Vasodilatation der Vasa afferentia und Vasokonstriktion der Vasa efferentia sowie eine Relaxation von glomerulären Mesangialzellen. Des Weiteren wird eine erhöhte Natriurese aufgrund der Hemmung von Na^+/H^+ -Austauschern im proximalen Tubulus, Chlorid-Cotransportern im distalen Tubulus sowie Natrium-Kanälen im Sammelrohr hervorgerufen [39], [215], [218]. Es konnte gezeigt werden, dass renales, interstitielles cGMP als second messenger der natriuretischen Peptide bei der Bluthochdruck-induzierten Natriurese beteiligt ist [108]. Schließlich wird eine erhöhte Diurese durch Hemmung des Vasopressin-induzierten Einbaus von Aquaporin 2 in apikale Zellmembranen des renalen Sammelrohrs herbeigeführt [119].

A.2.4 Aquaporine

Aquaporine sind eine Gruppe von partiell glycosylierten Proteinen, welche in der hydrophoben Plasmamembran von Zellen vorkommen und als Wasserkanäle die Membranpermeabilität für Wasser erhöhen. Es handelt sich hierbei um Tetramere mit einem Monomer-Molekulargewicht von ca. 30kDa [244]. Ein Monomer durchspannt die Membran mit 6 Transmembrandomänen, wobei sowohl der amino- als auch der carboxy-terminale Bereich intrazellulär positioniert ist; jedes Monomer bildet eine funktionell unabhängige Wasserpore [128], [186]. Diese Wasserkanäle sind in Zellen sämtlicher Lebensformen präsent, intensive Untersuchungen wurden v.a. an Säugetieren und Pflanzen durchgeführt. Nach heutigem Kenntnisstand wurden bislang 13 verschiedene Aquaporin-Subtypen in Säugetieren klassifiziert: AQP0-AQP12 [3]. Hauptsächlich sind diese in Epithelien und Endothelien von Geweben lokalisiert, in welchen ein aktiver Flüssigkeitstransport stattfindet, so u.a. der Niere, der Augenlinse, der Lunge oder auch dem Gastrointestinaltrakt [128], [244]. Während die meisten Aquaporine ihrem Namen nach Wasserkanäle darstellen, können durch manche Subtypen auch Glycerol und andere Substanzen wie z.B. Harnstoff oder Ammoniak die Zellmembran passieren (AQP 3, -7, -9 und -10), weshalb diese Isoformen auch Aquaglyceroporine genannt werden [128], [197], [244].

Bislang wurden renal acht Aquaporin-Subtypen nachgewiesen, von welchen fünf eine Rolle bei der Aufrechterhaltung des Wasser-Gleichgewichts im Körper spielen (AQP1, -2, -3, -4 und -7) [125]. AQP1 wird sowohl luminal als auch basolateral im proximalen Tubulus, im absteigenden dünnen Schenkel der Henle-Schleife sowie in den absteigenden Vasa recta endothelia exprimiert und besitzt eine kritische Funktion bei der Urin-Aufkonzentrierung [16]. AQP2, -3 und -4 befinden sich renal in Hauptzellen des Sammelrohrs. Während AQP2 apikal den Durchtritt von Wasser aus dem Tubulus-Lumen in das Zellinnere der Hauptzellen ermöglicht, kann dieses die Zelle auf basolateraler Seite durch AQP3 und -4 wieder verlassen [57], [104], [186]. AQP7 wird apikal im proximalen Tubulus exprimiert und wird als Aquaglyceroporin hauptsächlich für die Reabsorption von Glycerol verantwortlich gemacht [221]. Interessanterweise steht AQP6 (exprimiert in intrazellulären Vesikeln von Sammelrohr-Zwischenzellen des α -Typs) in Verdacht, pH-abhängig die Permeabilität dieser Zellen für Anionen zu erhöhen [179], [263].

A.2.4.1 Regulation von AQP2

Aquaporin 2 wird nach bisherigem Kenntnisstand ausschließlich in der Niere exprimiert und nimmt deshalb eine Sonderstellung unter diesen Wasserkanälen ein. Das Protein war bereits Gegenstand zahlreicher Untersuchungen, so dass bereits mehrere regulatorische Mechanismen aufgeklärt wurden. Diese umfassen zum einen die Langzeit-Regulation auf transkriptioneller und translationeller Ebene, welche u.a. cAMP-responsive elements im Gen-Promotorbereich beinhaltet (reviewed 2012 in [180]) und vermutlich erstrangig unter pathophysiologischen Bedingungen eine wichtige Bedeutung erlangen. Zum anderen spielt die Kurzzeitregulation mittels posttranslationaler AQP2-Proteinmodifikation bei der renalen Einstellung der Wasser-Homöostase eine wichtige Rolle. Hier dürften v.a. die Vasopressin-vermittelten

Regulationsmechanismen als gesichert gelten (dargestellt in Abb. 5). Nachdem Vasopressin mit dem Blutstrom am Sammelrohr anflutet, wird es basolateral am V₂-Rezeptor gebunden. Diese Rezeptoren sind gekoppelt an stimulatorische heterotrimere G-Proteine (GPCRs, G_s-Kopplung); durch die Bindung des Hormons wird die α -Untereinheit dieser Proteine aktiviert; es erfolgt ein Austausch von gebundenem GDP zu GTP. Infolgedessen dissoziiert die α -Untereinheit von der $\beta\gamma$ -Untereinheit und aktiviert die cyclische Adenylat-Cyclase, welche fortan ATP zu cAMP konvertiert. cAMP bewirkt eine Aktivitätssteigerung der Proteinkinase A; welche nachfolgend AQP2 an Ser256 phosphoryliert. AQP2 ist im inaktiven Zustand intrazellulär in Vesikeln gespeichert, die PKA-vermittelte Phosphorylierung führt zu einer apikalen Membran-Translokation und -fusion dieser Vesikel, so dass die Wasserkanäle letztlich die Membran durchspannen und Wasser entsprechend dem osmotischen Gradienten in die Zelle einströmen kann (Membran-Shuttling-Hypothese) [161], [192], [198], [247]. Für die Interaktion zwischen der PKA und AQP2 sind verschiedene PKA-Ankerproteine (AKAPs) nötig, die das Enzym in räumliche Nähe der Wasserkanäle bringen und an subzelluläre Kompartimente fixieren [120]. Bislang ist unklar, wie die Phosphorylierung an Ser256 die Translokation von AQP2 zur Zellmembran bewirkt. Eventuell könnte hierdurch die Interaktion der AQP2-enthaltenden Vesikel mit dem Cytoskelett modifiziert werden; eine zusätzliche Möglichkeit bestünde darin, dass die Phosphorylierung die Endozytose von Wasserkanälen, die bereits in der Membran vorliegen, verhindert [31]. In den letzten Jahren wurde gezeigt, dass durch die Phosphorylierung tatsächlich die Clathrin-vermittelte Endozytose gehemmt wird [32], [153]. Neben Ser256 wurden mittels Massenspektrometrie drei weitere AQP2-Phosphorylierungsstellen aufgeklärt: Ser261, Ser264 und Ser269. Interessanterweise ist an Ser269 phosphoryliertes AQP2 ausschließlich in der apikalen Plasmamembran lokalisiert, so dass eine Phosphorylierung an dieser Aminosäure wohl mutmaßlich eine Internalisierung des Wasserkanals hemmt [95], [152], [260]. Die zugrundeliegenden Signaltransduktionsmechanismen und beteiligten Kinasen sowie *in vivo* Effekte der Phosphorylierung an den weiteren Phosphorylierungsstellen sind jedoch noch weitestgehend ungeklärt.

Die ANP-vermittelte Regulation von Aquaporin 2 wird kontrovers diskutiert. Einerseits wurde nach ANP-Inkubation eine Stimulation der AQP2-Translokation in die apikale Zellmembran von LLC-PK1-Zellen gezeigt [28]. Nach Gabe von Sildenafil, einem selektiven PDEV-Inhibitor (und damit einhergehender cGMP-Akkumulation) wurden diese Ergebnisse später zusätzlich *in vivo* im Rattenmodell bestätigt [30]. Zu ähnlichen Resultaten gelangte auch eine neuere Studie, in welcher murine corticale Sammelrohrzellen mit ANP bzw. 8-Bromo-cGMP (ein membran-permeables cGMP-Analogon) vorinkubiert wurden [26]. Im Gegensatz dazu wurde eine durch ANP/cGMP-vermittelte Antagonisierung der Vasopressin-stimulierten Wasser-Reabsorption anhand von Mikrodissektionen corticaler Sammelrohre der Ratte gezeigt [165]. Auch *in vitro*-Untersuchungen an primären innermedullären Sammelrohrzellen deuten eher auf eine ANP-induzierte Hemmung des AQP2-Membraneinbaus hin [119]. Über die Signalproteine, die downstream von ANP/cGMP agieren, ist bezüglich der AQP2-Regulation bis heute kaum etwas

bekannt. Lediglich *in vitro* wurde anhand von Phosphorylierungs-Assays belegt, dass die katalytische Untereinheit der cGMP-abhängigen Proteinkinase in der Lage ist, AQP2 zu phosphorylieren [28].

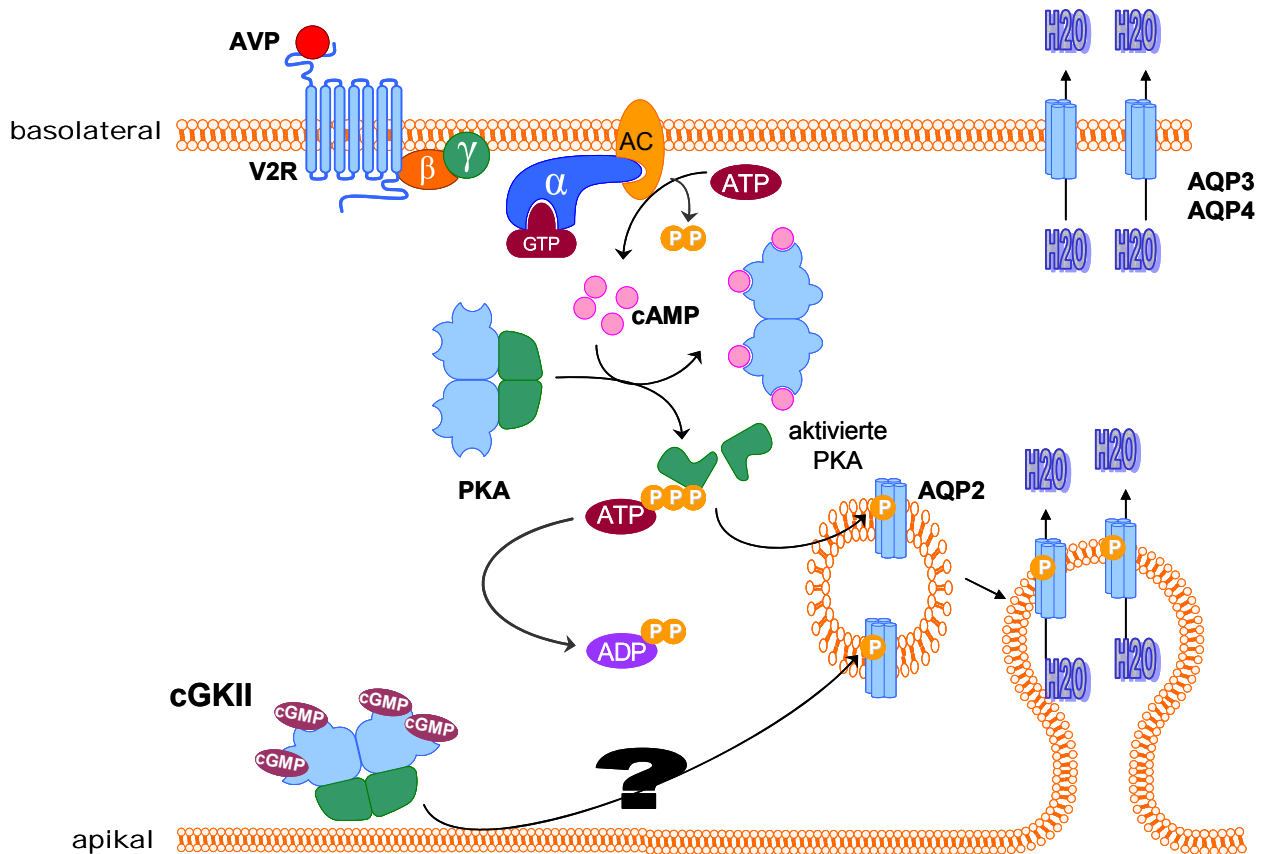


Abb. 5: Die Wasser-Rückresorption im Sammelrohr

Die Regulation von Aquaporin 2 (AQP2) mittels Membran-Shuttling unterliegt der hormonellen Kontrolle von Vasopressin (AVP), welches nach Bindung an V₂-Rezeptoren (V2R) G-Protein-gekoppelt die Generierung von cAMP durch die Adenylat-Cyclase (AC) triggert. cAMP aktiviert die Proteinkinase A (PKA), wodurch in intrazellulären Vesikeln gespeichertes AQP2 an Ser256 phosphoryliert wird. Dies induziert eine Vesikelverschmelzung mit der apikalen Plasmamembran, so dass AQP2 auf der Zelloberfläche präsentiert wird und Wasser in die Zelle eintreten kann. Über die basolateral membranständigen Isoformen AQP3 und AQP4 wird dieses wieder dem Blutstrom zugeführt. Weitere Erklärungen siehe Text.

A.2.4.2 Pathophysiologische Defekte des Vasopressin/AQP2-Systems

Defekte in der Vasopressin-Aquaporin 2-Achse manifestieren sich klinisch in Form des Diabetes insipidus und treten als stark gesteigerte Diurese (Polyurie) sowie in kompensatorischem Durstgefühl (Polydipsie) in Erscheinung. Bei unbehandelten Kindern können Entwicklungsverzögerungen auftreten, die schlimmstenfalls aufgrund der wiederholten hypernatriämischen Dehydratation zu dauerhaften Hirnschädigungen und mentaler Retardierung führen [21]. Generell wird unterschieden zwischen dem Diabetes insipidus centralis (DCI), bei welchem Vasopressin in Hypothalamus bzw. Hypophyse gar nicht oder nur unzureichend/falsch

synthetisiert bzw. sezerniert wird, sowie dem Diabetes insipidus renalis (auch nephrogener Diabetes insipidus, NDI). Diese Form ist charakterisiert durch die Unfähigkeit des renalen Sammelrohrs, auf einen Anstieg der Plasma-Vasopressin-Spiegel angemessen zu reagieren, so dass die Urin-Aufkonzentrierung nur unzureichend stattfinden kann. Der NDI kann nochmals in 4 unterschiedliche Typen untergliedert werden. Bei der häufigsten Form, dem erworbenen NDI, liegen u.a. iatrogene Nebenwirkungen von Medikamenten wie z.B. dem anti-bipolaren Psychotherapeutikum Lithium zugrunde [49]. Neben einer drastischen Reduktion der AQP2-Expression findet weiterhin ein Remodelling der Sammelrohrzellen statt, welches das Verhältnis von Zwischenzellen und Hauptzellen signifikant ändert [47]. Daneben führen auch eine chronische Hypokaliämie sowie gesteigerte Calcium-Spiegel zu einer verminderten apikalen AQP2-Expression [186]. Interessanterweise kann weiterhin eine Obstruktion der Harnleiter (Ureteren) einen NDI auslösen, wobei die Down-Regulierung von AQP2 vermutlich auf transkriptioneller Ebene stattfindet [139]. Schließlich ist ein zunehmendes Lebensalter ein weiterer Grund für eine AQP2-abhängig gesteigerte Diurese, welche unter Umständen auch erhöhten nächtlichen Harndrang (Nykturie) hervorruft [195]. Bei den weiteren Formen des NDI handelt es sich um genetische Mutationen, die entweder autosomal dominant, rezessiv oder X-chromosomal vererbt sind. Hierbei liegen die Mutationen bei den autosomalen Formen im *AQP2*-Gen selbst [53], [155], bei der gonosomalen Form im Gen für den V_2 -Rezeptor (*AVPR2*) [168], [187]. Im autosomal-dominanten NDI wird die C-terminale Domäne von AQP2 falsch codiert; diese ist essentiell für den Membraneinbau des Proteins (hier befinden sich u.a. die zur Regulation nötigen Phosphorylierungsstellen), so dass bereits eine heterozygote Mutation zur phänotypischen Ausprägung führt [213]. Im Gegensatz dazu sind bei der autosomal-rezessiven Form die Transmembrandomänen mutiert [155]. Für X-chromosomal vererbten NDI, die häufigste Form des vererbaren NDI, sind inzwischen über 200 unterschiedliche Mutationen bekannt. Missense-Mutationen treten hierbei gehäuft auf und rufen eine Retention der per se funktionellen V_2 -Rezeptoren im endoplasmatischen Reticulum (ER) hervor [186]. Ein Ansatzpunkt der pharmakologischen Therapie ist deshalb, mit Hilfe von chemischen Chaperonen den Transfer aus dem ER zur Zellmembran zu ermöglichen (siehe unten).

Neben pathophysiologischen Defekten, die zu einer verminderten/absenten AQP2-Expression führen, tritt als Folge bestimmter Medikamente (Antidepressiva wie SSRIs, Thiazide) oder verschiedener Erkrankungen (z.B. kongestive Herzinsuffizienz, Leberzirrhose) u.U. eine erhöhte Vasopressin-Sekretion auf, so dass die dadurch gesteigerte apikale AQP2-Expression eine Wasserretention induziert. Auch während einer Schwangerschaft wird AQP2 Vasopressin-abhängig v.a. innermedullär verstärkt apikal exprimiert, so dass als Folge Ödeme auftreten können [186], [206]. Schlimmstenfalls bewirkt die Wasserretention aufgrund erhöhter Vasopressin-Spiegel und damit einhergehender Steigerung des Plasmavolumens eine lebensbedrohliche Hyponatriämie, weshalb die Vasopressin-Antagonisierung mittels Vaptanen besondere klinische Bedeutung erlangt (siehe unten).

Eine weitere AQP2-assoziierte Wasser-Retention und Hyponatriämie tritt bei SIAD (Syndrom der inadäquaten Antidiurese) auf. Diese basiert auf verschiedenen, endogenen, exogenen und idiopathischen Ursachen, die häufig zu einer gesteigerten Vasopressin-Produktion führen und meist mit malignen Tumoren in Zusammenhang stehen [62]. Ursprünglich wurden signifikant erhöhte Vasopressin-Spiegel alleine für die Wasser-Retention verantwortlich gemacht, beobachtet in Lungenkrebs-Patienten (Schwartz-Bartter-Syndrom, SIADH); diese Beobachtung wurde inzwischen jedoch erweitert, da z.B. bestimmte Arzneistoffe wie Chlorpropamid oder auch Carbamazepin eine Potenzierung des Vasopressin-Effekts hervorrufen, ohne den Serumspiegel zu erhöhen [60], [99]. Die Unterscheidung zwischen SIAD-bedingter Hyponatriämie und anderen Ursachen ist komplex und wird mittels Ausschluss-Diagnose geführt; als therapeutische Maßnahmen sind neben einer Restriktion der Flüssigkeitsaufnahme sowie zusätzlicher Salzaufnahme häufig Vasopressin-Rezeptor-Antagonisten indiziert [62].

A.2.4.3 Pharmakologische Beeinflussung des Vasopressin/AQP2-Systems

Die ersten Vasopressin-Analoga als Antidiuretika, allen voran Desmopressin (dDAVP), wurden vor fast 50 Jahren erstmals synthetisiert und sind bis heute das Mittel der Wahl bei der Behandlung von Diabetes insipidus centralis sowie der Enuresis bzw. Nykturie [135], [243]. Erstmals unter dem Namen Minirin auf dem deutschen Markt eingeführt, sind mittlerweile diverse Generika im Handel; die Darreichungsformen reichen von oral applizierten Lösungen über Nasensprays bis hin zu Injektionslösungen. Vasopressin-Rezeptoren existieren neben dem rein renal lokalisierten V_2 -Rezeptor in zwei weiteren Isoformen (V_{1a} - und V_{1b} -Rezeptoren), v.a. V_{1a} -Rezeptoren werden in diversen Organen, u.a. in Leber, vaskulären Glattmuskel-Zellen und Gehirn exprimiert [68]. dDAVP wirkt nicht selektiv auf V_2 -Rezeptoren; eine hohe Affinität wurde auch für V_{1b} - sowie strukturell verwandte Oxytocin-Rezeptoren beschrieben [199]. Die Suche nach selektiven V_2 -Rezeptor-Agonisten dauert allerdings bis heute an.

Gerade für die Behandlung des X-chromosomal vererbten NDI wurden intensive Studien durchgeführt, die zum Ziel hatten, sog. chemische/pharmakologische Chaperone zu entwickeln. V_2 -Rezeptoren, welche infolge von missense-Mutationen im ER zurückgehalten werden, sollten hierbei stabilisiert und somit die Weiterleitung zur Zellmembran ermöglicht werden. Als besonders effektiv für verschiedene Mutationen erwies sich hierbei die zellpermeable Substanz SR121463 (Satavaptan), zumal diese hochselektiv an V_2 -Rezeptoren bindet und die basolaterale Membranlokalisation derselben wiederherstellt. [154]. Da jedoch an der Zelloberfläche die Bindung von Vasopressin durch diese Substanzen antagonisiert wird, sind hohe Konzentrationen des Hormons erforderlich, um den Antagonisten von den wiederhergestellten Rezeptoren zu verdrängen. Wirksame Konzentrationen konnten auch bei weniger selektiven Antagonisten nur unter zusätzlicher Gabe von Vasopressin-Analoga erreicht werden [19].

Während sich Vasopressin-Rezeptorantagonisten somit als bislang nur von geringem therapeutischen Nutzen bei NDI herausstellten, ist diese Antagonisierung bei Erkrankungen mit

vermehrter Antidiurese und nachfolgender Hyponatriämie sehr förderlich. So wurde im Laufe der letzten Jahre diesbezüglich eine neue diuretische Wirkstoffklasse, die Vaptane, auf dem Markt eingeführt. Je nach Selektivität sind Vaptane bei Herzinsuffizienz, Leberinsuffizienz und SIAD indiziert, da hierbei häufig eine euvolämische oder hypervolämische Hyponatriämie mit einer Plasmakonzentration $<135\text{mM}$ folgt. Bei jedem fünften hospitalisierten Patienten tritt solch eine Elektrolyt-Störung auf, meist aufgrund einer verstärkten Wasser-Retention. Eine Antagonisierung der Vasopressin-Rezeptoren bewirkt renal aufgrund der verminderten AQP2-Membranlokalisation letztlich eine verstärkte Diurese, so dass die Plasmaosmolarität erhöht wird. Conivaptan (Handelsname Vaprisol®, FDA-Zulassung seit 2005) wirkt nicht-selektiv auf V_{1a} - und V_2 -Rezeptoren [228]. Da somit systemische Nebenwirkungen nicht ausgeschlossen werden können, bietet Tolvaptan als selektiverer V_2 -Antagonist deutliche Vorteile. Nach intensiver Prüfung in zwei Phase-III-Studien (SALT 1 und 2, sowie Erweiterungsstudie SALTWATER) erhielt der Wirkstoff unter dem Handelsnamen Samsca™ 2009 die EMEA-Zulassung (FDA-Zulassung seit 2007) [18]. Die Forschung an dem bereits oben genannten V_2 -selektiven Wirkstoff Satavaptan zur Behandlung der Ascites wurde kürzlich nach Prüfung in Phase-III-Studien von Sanofi eingestellt [207], [251].

A.2.5 Der epitheliale Natriumkanal – Feinsteuerung der Natrium-Konzentrationen im Endharn

Der epitheliale Natriumkanal (ENaC) wird in der apikalen Zellmembran vieler Natrium-reabsorbierender Epithelien exprimiert, so u.a. in der Niere, im Colon, in Schweiß- und Speicheldrüsen und im Alveolar-Epithel [78], [141]. Renal ist dieser im Aldosteron-sensiblen distalen Nephron (ASDN) lokalisiert, welches von der Pars convoluta des distalen Tubulus bis in das äußer-medulläre Sammelrohr reicht [189]. Weiterhin ist das Protein auch in inner-medullären Sammelrohrzellen nachgewiesen worden, wenngleich die Bedeutung des Natrium-Transports in diesem Sammelrohrabschnitt bislang nicht bekannt ist [70]. Die Expression in Colon und Niere sowie die Tatsache, dass der ENaC ein wichtiges Effektorprotein des RAAS darstellt, macht seine Bedeutung für die Aufrechterhaltung des Salzhaushaltes im Organismus deutlich. Es handelt sich hierbei um einen hetero-multimeren Komplex aus drei Untereinheiten (α, β, γ), wobei die Stöchiometrie mangels Röntgenstrukturanalysen bislang nicht geklärt ist (es wird angenommen, dass es sich um ein Heterotrimer der drei Untereinheiten handelt, da ein strukturell verwandter Ionenkanal, ASIC1 solch eine Quartärstruktur aufweist [113]). Im ASDN ist ENaC verantwortlich für die Feinsteuerung der Natriumausscheidung. Ähnlich wie Aquaporin die Membranpermeabilität für Wasser erhöht, vermittelt dieser Natriumkanal eine erleichterte Diffusion von Natrium aus dem Sammelrohr-Lumen in die Zelle, der hierzu nötige elektrochemische Gradient wird von der basolateral membranständigen $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ aufgebaut. Weiterhin erleichtert dieser Gradient neben der Aquaporin-gekoppelten Wasser-Resorption auch die parazelluläre Chlorid-Absorption sowie die transzelluläre Kalium-Sekretion, welches von der $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ in die Zelle gepumpt wird. Auch die Protonen-Sekretion aus

benachbarten Zwischenzellen wird indirekt durch die nach Natrium-Reabsorption negativer geladene Tubulus-Flüssigkeit angeregt [224]. Hierbei ist der Eintritt von Natrium in die Zelle der geschwindigkeitslimitierende Schritt [163], weshalb der Regulation von ENaC eine wichtige Bedeutung zukommt.

A.2.5.1 Regulation

Die Regulation von ENaC wird durch drei unterschiedliche Bedingungen determiniert: die Aktivität bzw. Offen-Wahrscheinlichkeit des einzelnen Kanals, die Anzahl der in der apikalen Membran lokalisierten Kanäle und die Triebkraft des Natrium-Einstroms, welche vom apikalen Membranpotential sowie vom Gleichgewichtspotenzial des Kations im Intra- und Extrazellarraum abhängt [146]. Eine Reihe von Hormonen trägt zur Regulation des ENaCs bei. Aldosteron gilt hierbei als einer der Hauptregulatoren (siehe auch Abb. 6). Das Steroidhormon bindet intrazellulär an Mineralocorticoidrezeptoren, welche als Liganden-induzierte Transkriptionsfaktoren in den Zellkern einwandern, an entsprechende Hormon-Response-Elements (HREs) in den Promotorsequenzen der Zielgene binden und eine gesteigerte Transkription bewirken. Renal sind mittlerweile diverse Aldosteron-induzierte Zielgene bekannt, u.a. codierende Gene für die α -Untereinheit von ENaC [147], die $\alpha 1/\beta 1\text{-Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ [123], den Kalium-Kanal ROMK [14] sowie Gene für verschiedene Kinasen (siehe unten).

Auch Vasopressin ist an der Regulation von ENaC beteiligt; es konnte gezeigt werden, dass Vasopressin die Offenwahrscheinlichkeit (P_0) des Kanals erhöht. Diese Effekte waren PKA-vermittelt, so dass die Phosphorylierung eine posttranslationale Modifizierung zur Aktivitätssteigerung des Kanals darstellt [35]. Auch eine cAMP/PKA-induzierte Translokation zur apikalen Zellmembran, ähnlich der Membran-Shuttling-Theorie im Falle von AQP2 wird diskutiert [219]. Interessanterweise führt auch osmotischer Stress (hypotoner Schock) zu einer Steigerung der Membran-Lokalisierung von ENaC. Hierbei sollen Tyrosin-Kinasen eine tragende Rolle spielen [162].

Bis heute wurde bereits eine Reihe an Kinasen identifiziert, die den epithelialen Natrium-Kanal direkt oder indirekt beeinflussen. Ein gut untersuchtes Beispiel ist die Serum-Glucocorticoid-Kinase (SGK), deren Gen-Transkription durch Aldosteron signifikant gesteigert wird [52]. Die SGK phosphoryliert NEDD4-2 (neural precursor cell-expressed developmentally down-regulated ubiquitin protein ligase), ein Enzym, welches die Addition von Ubiquitin-Molekülen an Target-Proteine katalysiert, so dass diese für die Degradation markiert werden. Eine Phosphorylierung von NEDD4-2 vermindert die Bindungsaffinität an ENaC, wodurch der proteolytische Abbau verlangsamt wird [52], [255]. Die PKA steht in Verdacht, durch Phosphorylierung der SGK nur einen indirekten Einfluss auf ENaC zu besitzen [234]. Allerdings wurde auch eine PKA-vermittelte Phosphorylierung von NEDD4-2 gezeigt, welche vergleichbare Auswirkungen auf die ENaC-Degradation wie die SGK-vermittelte Phosphorylierung hatte [220]. Eine direkte Phosphorylierung von ENaC durch die PKA konnte bislang nicht nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu wurde eine Phosphorylierung am carboxyterminalen Ende der β - sowie der γ -Untereinheit von ENaC

durch die MAP-Kinase (Mitogen-aktivierte Protein-Kinase, auch ERK 1/2 (extracellular signal-regulated kinase 1 and 2) genannt) belegt [151], [214]. Durch diese Modifikation wird die Bindung von NEDD4-2 an ENaC erleichtert, so dass die Membran-Verteilung des Kanals abnimmt und der Natrium-Einstrom vermindert wird [212].

Bezüglich der Regulation von ENaC durch natriuretische Peptide bzw. cGMP existieren bislang nur wenige Hinweise. Ähnlich wie bei der Aquaporin 2-Regulation wurden auch hier kontroverse Daten publiziert. Nach kontinuierlicher ANP-Infusion konnte im Rattenmodell eine Steigerung der apikalen Membranlokalisierung von ENaC beobachtet werden [250], auch in Zellkultur (Epithelzellen amphibischen Ursprungs) wurde ein erhöhter Natrium-Transport nach Inkubation mit ANP/cGMP nachgewiesen [261], [262]. Im Gegensatz dazu konnte in primären humanen bronchialen Epithelzellen nach Gabe von PDE5-Inhibitoren und damit einhergehender cGMP-Akkumulation eine Hemmung des Natrium-Kanals induziert werden [176]. Erste Hinweise, dass die cGKII an der Regulation von ENaC im Sinne einer Aktivitätssteigerung beteiligt ist, wurden in bronchialen Zellen sowie in ENaC-exprimierenden Oozyten gewonnen [160]. *In vivo* Daten zur cGKII-vermittelten Regulation des epithelialen Natriumkanals im renalen ASDN sind bislang jedoch nicht erhoben worden, so dass die NP/cGMP/cGK-vermittelte direkte bzw. indirekte Interaktion weiter strittig bleibt.

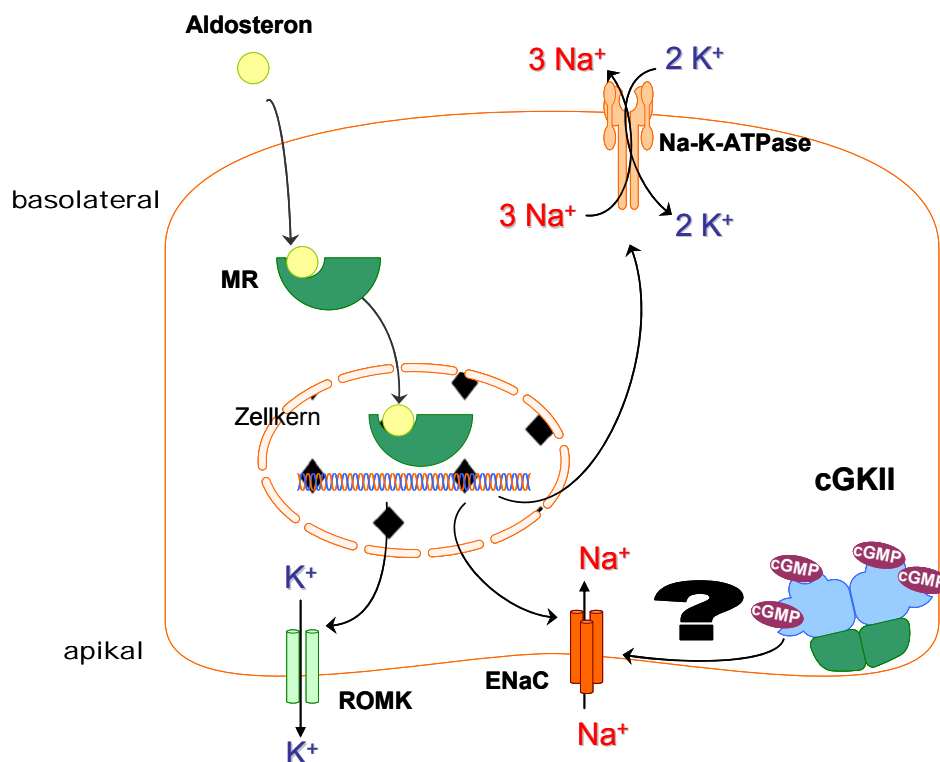


Abb. 6: Die Funktion von Aldosteron im DCT und Sammelrohr

Das membran-permeable Hormon Aldosteron bindet intrazellulär an Mineralocorticoid-Rezeptoren (MR). Der Hormon/Rezeptor-Komplex wandert in den Zellkern ein und bindet dort an chromosomale HRE-Sequenzen, wodurch die Transkription verschiedener Ziel-Gene gesteigert wird. Zu den derart regulierten Proteinen gehören u.a. ENaC und ROMK, sowie die basolateral exprimierte Na-K-ATPase. Weitere Erklärungen siehe Text.

A.2.5.2 Pathophysiologische Defekte des Aldosteron/ENaC-Systems

Neben Erkrankungen, die die Produktion bzw. Sezernierung von Aldosteron beeinflussen, wie z.B. dem Conn-Syndrom (primärer Hyperaldosteronismus) oder der Nebenniereninsuffizienz, sind v.a. genetisch bedingte Fehlfunktionen des ENaC klinisch bedeutsam. Das seltene, autosomal-dominant vererbte Liddle-Syndrom (Pseudohyperaldosteronismus) manifestiert sich in Salz-sensitivem Bluthochdruck. Folgeerscheinungen umfassen eine niedrige Plasma-Renin-Aktivität, geringe Aldosteron-Spiegel sowie eine verstärkte Kalium-Ausscheidung, welche zu Hypokaliämie und metabolischer Alkalose führt. Hierbei bewirken Mutationen in den β - bzw. γ -Untereinheiten des Kanals eine Membranretention aufgrund verlangsamter physiologischer Degradation (gain-of-function) [91], [140], so dass trotz einer normalen oder erniedrigten Aldosteron-Konzentration im ASDN verstärkt Natrium rückresorbiert wird. Im Gegensatz dazu liegt beim Pseudohypoaldosteronismus (PHA) eine erniedrigte Aldosteron-bedingte Natrium-Rückgewinnung vor, die wichtigsten klinischen Symptome sind folglich Hypotonie, Natriumverlust, metabolische Azidose sowie Hyperkaliämie. Es können zwei Formen des PHA unterschieden werden. Beim PHA Typ I wurden sowohl autosomal-dominante als auch -rezessive Vererbungsmuster beschrieben: Bei rezessiven Formen führen Mutationen in den ENaC-Untereinheiten [42], bei dem dominant vererbten PHA Typ I mutierte Mineralocorticoid-Rezeptoren [178] zu einem Funktionsverlust und damit einer fehlenden Aldosteron-Empfindlichkeit. PHA Typ II hingegen beruht auf Mutationen in *WNK*-Genen [258]. Vor allem die rezessive Form des PHA I bringt aufgrund der multi-epithelialen Expression von ENaC bereits neonatal zahlreiche systemische Symptome mit sich, allen voran diverse Lungenschwächen (reviewed 2012 in [127]), weshalb diese Form auch als systemischer PHA bezeichnet wird.

Interessanterweise deuten neuere Untersuchungen darauf hin, dass Sammelrohr-assozierte Remodelling-Prozesse beim Lithium-induzierten NDI mit ENaC in Zusammenhang stehen. Nach Gabe von Amilorid, einem ENaC-Antagonisten (siehe unten), kann die Urinaufkonzentrierung bei NDI-Patienten, die zusätzlich einer Lithium-Therapie unterzogen werden, wiederhergestellt werden [13]. Lithium kann aufgrund einer, verglichen mit Natrium höheren Permeabilität über den ENaC die Zellmembran von Hauptzellen passieren und dort akkumulieren [36], [85]. Kürzlich konnte anhand von konditionellen α -ENaC-KO-Mäusen gezeigt werden, dass die Lithium-Absorption nicht im Verbindungstubulus stattfindet, sondern auf das Sammelrohr beschränkt ist [48]. Der therapeutische Nutzen von Amilorid bei der Hemmung der Pathogenese dieser Erkrankung wird derzeit untersucht [12], [124].

A.2.5.3 Pharmakologische Beeinflussung von ENaC

Die Gabe von Schleifendiuretika oder Thiaziden bewirkt zwar einen starken diuretischen Effekt, hat jedoch den entscheidenden Nachteil, dass die erhöhte Natrium-Konzentration im Tubuluslumen des distalen Nephrons eine gesteigerte Natriumabsorption durch den ENaC und infolgedessen eine verstärkte Kaliurese bewirkt [84], [88]. Die damit verbundene Hypokaliämie und deren cardiale, glatt- sowie skelettmuskuläre Konsequenzen können durch Behandlung mit

Hemmstoffen des epithelialen Natriumkanals umgangen werden. Als erstes diesbezügliches Diuretikum wurde Amilorid beschrieben, welches im nanomolaren Konzentrationsbereich hoch affin an ENaC bindet und diesen durch Besetzung der Kanalpore reversibel inhibiert [17], [115]. In höherer Konzentration werden jedoch auch weitere Natrium-Kanäle wie z.B. NHE3 gehemmt, so dass potentere Amilorid-Analoga entwickelt wurden (Benzamil, Phenamil). Die orale Applikation von Amilorid führt zu einer schwachen Diurese und Natriurese bei gleichzeitiger Kalium-Retention, auch die Bicarbonat-Ausscheidung wird gesteigert. Da hierdurch das Extrazellulär-Volumen ohne Kaliumverlust gesenkt wird, ist dieses Medikament in Kombination mit anderen Diuretika (Thiazide) bei Krankheiten wie Bluthochdruck, kongestiver Herzinsuffizienz und Leberzirrhose indiziert [61]. Die häufigste Nebenwirkung bei ENaC-Blockern ist Hyperkaliämie [105]. Triamteren, ein weiterer ENaC-Antagonist, ist strukturell nicht verwandt mit Amilorid und von wesentlich geringerer Potenz [114]. Trotzdem findet es als Kombinations-Präparat (vergleichbar mit Amilorid) klinischen Einsatz bei der Behandlung von Bluthochdruck. Neuere Untersuchungen fokussieren sich auf die pulmonalen Isoformen des ENaC als Drug-Target zur Behandlung von Patienten mit cystischer Fibrose und anderer Lungenerkrankungen, besonders quartäre Pyrazinoyl-Verbindungen stellen hierbei interessante Kandidaten-Verbindungen dar [101], [102]. Inwieweit diese neuartigen ENaC-Inhibitoren den renalen transepithelialen Natriumtransport beeinflussen, ist nach heutigem Kenntnisstand noch unklar.

Neben der direkten Hemmung von ENaC existieren aufgrund der vielfältigen Regulatoren des Kanals einige weitere pharmakologische Zielstrukturen (reviewed 2013 in [4]), so z.B. die oben erwähnten Mineralocorticoid-Rezeptoren (Spironolacton, Epleneron). Aufgrund der zeitgleichen kompetitiven Antagonisierung von Androgen- und Progesteronrezeptoren haben diese Diuretika diverse Nebenwirkungen [33], sie sind jedoch dank ihrer kaliumsparenden Wirkung trotzdem als Alternativen zu Amilorid im klinischen Einsatz [61]. Ein weiteres Beispiel für ein ENaC-regulierendes Zielprotein, welches im Fokus der Pharmaindustrie steht, ist die oben genannte SGK [1], [211]. Es konnte gezeigt werden, dass EMD638683, ein spezifischer SGK1-Antagonist, in einem murinen Hypertonie-Modell eine Blutdrucksenkung herbeiführen konnte, so dass sich hieraus möglicherweise Therapiemöglichkeiten für Typ II-Diabetes-assoziierten Bluthochdruck ergeben [1].

Neben der Hemmung des ENaC-vermittelten Natriumtransports kann unter bestimmten pathophysiologischen Bedingungen wie Pseudo-Hypoaldosteronismus Typ I oder Hypotonie auch eine Aktivierung desselben sinnvoll sein. Bislang sind jedoch nur wenige ENaC-Aktivatoren bekannt, diese verfügen zudem über eine niedrige Effizienz und geringe Spezifität. Vor einiger Zeit wurde diesbezüglich eine neuartige Substanz (S3969) mit potenter, reversibler und stimulatorischer Wirkung auf die Offenwahrscheinlichkeit des Kanals publiziert [143], allerdings sind weitere Untersuchungen nötig, um die pharmakologische Relevanz dieses ENaC-Aktivators näher zu charakterisieren.

A.3 Ziele und Fragestellung

Im Jahr 2012 wurden in Deutschland rund 2500 Nieren transplantiert, etwa 8000 Patienten sind derzeit aufgrund terminalen Nierenversagens auf eine Spenderniere angewiesen (Quelle: Deutsche Stiftung Organtransplantation). Diese Zahlen machen deutlich, dass der Erforschung grundlegender renaler Regulationsmechanismen bis heute ein hoher Stellenwert zukommt, da diese die Basis für weiterführende pathophysiologische Prozesse bilden. In dieser Arbeit soll die Relevanz des cGMP-Signallings in der Niere mit besonderem Augenmerk auf der Funktion der cGMP-abhängigen Proteinkinase II (cGKII) näher charakterisiert werden. Für funktionelle Untersuchungen sind Antikörper ein sehr hilfreiches Tool, die derzeit kommerziell erhältlichen Antikörper gegen die cGKII sind jedoch in renalem Gewebe nicht hinreichend spezifisch. Aus diesem Grund besteht ein Ziel dieser Arbeit in der molekularbiologischen Expression der N-terminalen Domäne des Enzyms in E.coli für die Immunisierung von Kaninchen und der nachfolgenden Spezifitätsanalyse der erhaltenen Antikörper.

Natriuretische Peptide verursachen eine Natriurese und Diurese, die zugrundeliegenden Signaltransduktionsmechanismen sind jedoch bis heute noch weitestgehend unklar. Vorarbeiten zeigen eine mögliche Lokalisierung der cGKII in Sammelrohrzellen; die cGMP-abhängige Regulation von AQP2 wird kontrovers diskutiert. Weiterhin wird die cGKII mit der Regulation von Ionenkanälen im Gastrointestinaltrakt (CFTR, NHE3) in Verbindung gebracht, so dass die Vermutung naheliegt, dass die Kinase auch in der Niere die Ionenausscheidung beeinflussen könnte. Beim Haupteffektorprotein für die Natrium-Reabsorption im Sammelrohr handelt es sich um ENaC; erste Hinweise deuten auf regulatorische Prozesse hin, welche cGMP involvieren. Auf Basis dieser Voruntersuchungen befasst sich diese Arbeit mit der Beteiligung des cGKII-abhängigen Signallings bei renalen Sammelrohr-assoziierten Aufkonzentrierungsmechanismen unter basalen und forcierten physiologischen Bedingungen mit speziellem Augenmerk auf der Regulation von AQP2 und ENaC.

B. Material und Methoden

B.1 Materialien

B.1.1 Geräte

Neben der Labor-Grundausrüstung wurde in dieser Arbeit mit folgenden Geräten gearbeitet:

Gerät	Bezeichnung/Hersteller
Blotting Apparatur	Semi-Dry Elektrophoret, VWR International, Darmstadt, D
DNA- Elektrophorese-Kammer	Casting System Compact Biometra, Biometra, Göttingen, D
Elektrolyt-Analyzer	Roche 9180 Electrolyte-Analyzer, Roche Diagnostics, Basel, CH
Flammenphotometer	M410 flame photometer, Sherwood-Scientific Ltd, Cambridge, UK
HPLC mit photometrischem Detektor	Prominence LC20 series mit LC20A-Detektor (225nm), Shimadzu, Duisburg, D
HPLC-Säule (Kreatinin-Bestimmung)	Zorbax SCX 5µm, 150x4,6mm, Agilent, Waldbronn, D
Konfokales Laser-Scanning-Mikroskop	Axio-Vert 200 M gekoppelt an Scan-Einheit LSM 510, Carl Zeiss, Jena, D
Mikroskop	Axio-Observer Z1, Carl Zeiss, Jena, D
Operationsbesteck	Fine Science Tools GmbH, Heidelberg, D
Osmometer	Osmomat 030, Gonotec GmbH, Berlin, D
PCR-Thermocycler	Biometra T1 Thermocycler, Biometra GmbH, Göttingen, D
pH-Meter	pH 526,WTW, Weilheim, D
Photoentwickler	Cawomat 2000 IR, Cawo, Schrobenehausen, D
Pipetten	Rainin Pipet Lite Classic, Mettler-Toledo, Gießen, D
Rotationsmikrotom	Microm HM355S, Thermo Scientific, Rockford, USA
SDS-PAGE-System	Mini Protean Tetracell, Biorad, München, D
Qubit-Photometer (Protein/DNA-Konzentrationsbestimmung)	Qubit System, invitrogen life technologies GmbH, Darmstadt, D
Schlundsonden	Fine Science Tools GmbH, Heidelberg, D
Stoffwechselkäfge	Tecniplast Deutschland GmbH, Hohenpeißenberg, D
Tail-Cuff-Blutdruckmessvorrichtung mit Verstärker	IITC Life Science Inc, Woodland Hills LA, CA, US
Ultra-Turrax	IKA Werke, Staufen, D
Vakuum-Eindampfer	Jouan RC 10.22., Unterhaching, D
Zentrifugen	Sorvall Super T21, Kendro Laboratory Products GmbH, Hanau, D
	Mikro 220R, Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, D
	Centrifuge 5424, Eppendorf, Hamburg, D
	Multifuge 1L-R, Heraeus, Hanau, D
	Centrifuge + Vortex CM-70M, NeoLab, Heidelberg, D
	Kontron TGA 45, Rotor: TFT 65.13, Kontron Instruments, Zürich, CH

Tab. 2: Liste der verwendeten Geräte

B.1.2 Chemikalien, Arzneistoffe, Verbrauchsmaterialien und Kits

Chemikalien und Verbrauchsmaterialien wurden, sofern nicht explizit in der nachfolgenden Tabelle erwähnt, von folgenden Firmen bezogen: AppliChem, Darmstadt, D; BD, Heidelberg, D; Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe, D; Eppendorf, Hamburg, D; Fisher Scientific, Fair Lawn, New Jersey, USA; Fluka Chemie GmbH, Buchs, CH; Merck, Darmstadt, D; Saliter, Obergünzburg, D; Sarstedt, Nümbrecht, D; Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D; USB Corporation, Cleveland, USA; VWR International, Darmstadt, D; Whatman, Düsseldorf, D.

B. Material und Methoden

Produkt	Bezeichnung/Hersteller
8-AET-cGMP-Agarose	Biolog Life Science, Bremen, D
Antibiotika	Fluka, Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
Aldosteron-ELISA	IBL International GmbH, Hamburg, D
Amilorid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
Aufkonzentrierungs-Säulen	Vivaspin 6, Vivaproducts Inc., MA, US
BrCN-Sepharose	Pharmacia Biotech, Uppsala, SE
Brilliant Blue G (Coomassie)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
Brilliant Blue R (Coomassie)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
cGMP-ELISA	Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, US
DNA-Größenstandard	Gene Ruler, 100bp, Fermentas, St. Leon-Rot, D Gene Ruler, 1kb, Fermentas, St. Leon-Rot, D
DNA-Loading Dye 6x	Fermentas, St. Leon-Rot, D
dNTP-Mix	Fermentas, St. Leon-Rot, D
Entwickler/Fixierer	Ernst Christian GmbH, Planegg, D
Gelextraktions-Kit für Agarose-Gele	QIAquick Gel extraction Kit, Qiagen, Hilden, D
Heparin	Heparin-Natrium-25000, Ratiopharm, Ulm, D
Heparinisierte Kapillaren (retrobulbäre Blutabnahme)	Mikro-Hämatokrit-Kapillaren, Na-hep, Brand GmbH, Wertheim, D
IPTG zur Expressions-Induktion	Appllichem, Darmstadt, D
Isofluran	FMI GmbH, Seeheim/Ober-Beerbach, D
Ketamin	WDT, Garbsen, D
LB-Fertigmischung	LB Broth, Fisher Scientific, Schwerte, D
Luminolreagenzien	Thermo-Scientific, Rockford, USA
Lysozym	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
Mounting Medium Immunhistochemie	Dako Glycergel Mounting Medium, Dako, Hamburg, D
Ni-NTA-Matrix (Slurry) zur Proteinaufreinigung	Qiagen, Hilden, D
Objektträger	Polysine TM, Meinel-Gläser, Braunschweig, D
Paraffin	Paraplast X-tra P3808, Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
Pfx-Polymerase & Puffer	invitrogen life technologies GmbH, Darmstadt, D
PhosStop	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, D
Photofilme	Amersham Hyperfilm ECL, GE Healthcare Buckinghamshire, UK
Plasmid Maxi-Prep-Kit	Qiagen, Hilden, D
Plasmid Mini-Prep-Kit	PeqLab, Erlangen, D
Platinum Pfx DNA-Polymerase	invitrogen life technologies GmbH, Darmstadt, D
Protein-A-Sepharose	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
Protein-Größenmarker	Page Ruler Plus Prestained bzw. Unstained, Thermo Scientific, Rockford, USA SeeBlue Plus2 Pre-stained Standard, invitrogen life technologies GmbH, Darmstadt, D
Protein-G-Sepharose	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
pRSETB-Expressionsvektor	invitrogen life technologies GmbH, Darmstadt, D
PVDF-Membran	Immobilon, Millipore GmbH, Schwalbach, D
Restriktionsenzyme & Puffer	New England Biolabs (NEB), Ipswich, MA, US
Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP)	Fermentas, St. Leon-Rot, D
T4-DNA-Ligase	Quick Ligation Kit, New England Biolabs (NEB), Ipswich, MA, US
Vasopressin-ELISA	Enzo Life Sciences, Lörrach, D
Xylazin	Serumwerk Bernburg AG, Bernburg, D

Tab. 3: Liste der verwendeten Chemikalien, Arzneistoffe, Verbrauchsmaterialien und Kits

B.1.3 Verwendete Antikörper für Western Blot (WB) und Immunhistochemie (IH)

Antikörper gegen	Art	Tier	Verdünnung in		Herkunft
WB	IH				
AQP2 (sc-9882)	primär	goat	1:2000	1:100	Santa Cruz, Heidelberg, D
cGKI α	primär	rabbit	1:80		Lehrstuhlinterne Herstellung
cGKI β	primär	rabbit	1:100		Lehrstuhlinterne Herstellung
Beta-Actin (ab-8227)	primär	rabbit	1:2500		Abcam, Cambridge, UK
P-AQP2 (Ser256) (ab-111346)	primär	rabbit	1:1000	1:100	Abcam, Cambridge, UK
NKCC2 (T4)	primär	rabbit	1:500		Prof. Dr. Forbush, Yale, US
P-NKCC2 (R5)	primär	rabbit	1:1000	1:100	Prof. Dr. Forbush, Yale, US
HisTag	primär	mouse	1:200		Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, D
β -ENaC	primär	rabbit	1:2500	1:600	Prof. Dr. Korbmayer, Erlangen, D
Na-K-ATPase	primär	mouse	1:3000		Santa Cruz, Heidelberg, D
Rab5A	primär	rabbit	1:250		Santa Cruz, Heidelberg, D
Mouse IgG HRP-conjugated	sekundär	donkey	1:25000		Dianova, Hamburg, D
Rabbit IgG HRP-conjugated	sekundär	goat	1:25000		Dianova, Hamburg, D
Goat IgG HRP-conjugated	sekundär	rabbit	1:10000		Dianova, Hamburg, D
Goat IgG Cy2-conjugated	sekundär	donkey		1:400	Dianova, Hamburg, D
Rabbit IgG Alexa647-conjugated	sekundär	goat		1:400	invitrogen life technologies GmbH, Darmstadt, D

Tab. 4: Verwendete Antikörper

B.1.4 Puffer und Lösungen

Bezeichnung	Zusammensetzung
Anodenpuffer A1 Western Blot	36,3 g/l Tris; 20% Methanol; pH 10,4
Anodenpuffer A2 Western Blot	3,6 g/l Tris; 20% Methanol; pH 10,4
Anoden-Puffer Tricin-Gel	24,2g/l Tris, ad 1l MQ-H ₂ O; pH 8,9
Antikörper-Stammlösung	3% BSA/0,05% NaN ₃ in TBST
CaCl ₂ -Lösung (kompetente Zellen)	60mM CaCl ₂ x 2H ₂ O, 15% Glycerin, 10mM PIPES, pH 7,0
Coomassie-Entfärber	100ml konz. Essigsäure, 300ml Methanol, ad 1l MQ-H ₂ O
Coomassie-Färbereagenz	1,5g/l Coomassie Blue R-250, 455ml Methanol, 90ml konz. Essigsäure, ad 1l MQ-H ₂ O
Dissektions-Puffer (Membran-Preps)	0,3M Sucrose, 25mM Imidazol, 1mM EDTA, pH=7,2 + PI + PhosStop
DNA-Loading-Puffer (5x)	50mg Bromphenolblau, 0,6g Glycerin, ad 20ml MQ-H ₂ O
EK-Puffer (Protein-Aufreinigung)	50mM Tris, 1mM CaCl ₂ , pH 8,0
Fixierlösung Immunhistochemie	5,37g/l NaCl; 3,42g/l KH ₂ PO ₄ ; 0,38g/l EGTA; 0,41g/l MgCl ₂ ; 34,2g Glucose; 30g/l Paraformaldehyd; pH 7,4
Gelpuffer Tricin-Gel	181,7g/l Tris; 15ml 10% SDS, ad 500ml MQ-H ₂ O; pH 8,45
Kathodenpuffer Tricin-Gel	12,1g/l Tris, 17,9g/l Tricin, 10ml 10% SDS, ad 1l MQ-H ₂ O, pH 8,25
Kathodenpuffer Western Blot	3g/l Tris; 5,8g/l E-Aminocapronsäure; 20% Methanol; pH 7,6
Kopplungspuffer CNBr-Chromatographie	0,1M NaHCO ₃ , 0,5M NaCl, pH 8,3
Lämmli Sample Puffer 2x (27ml)	28,8g Urea; 1,5 g SDS; 1,8g Dithiothreitol(DTT); 1,5ml 1M Tris pH 8,0; 6,0ml Glycerol 50%; 6,0mg Bromphenol Blue, ad 27ml MQ-H ₂ O
LB-Agar	25g LB Broth, ad 1l MQ-H ₂ O, pH 7,5
LB-Medium	25g LB Broth, 15g Agar, ad 1l MQ-H ₂ O, pH 7,5
LEW-Puffer (Protein-Aufreinigung)	50mM NaH ₂ PO ₄ , 300mM NaCl, pH 8,0
Lubrol Puffer 2% Gewebeaufschluss	20mM Tris; 140mM NaCl, 2% Lubrol (Nonaethylenglycol-Monododecyl-Ether); pH 8,0
Mobile Phase HPLC	1000ml 100mM NaH ₂ PO ₄ , 80ml MeOH, 120ml CH ₃ CN
PBS	8g/l NaCl; 0,2g/l KCl; 1,44g/l Na ₂ HPO ₄ ; 0,2g/l KH ₂ PO ₄ ; pH 7,4
Protease-Inhibitoren (PI)	Endkonzentrationen: Benzamidin: 1mM; Leupeptin: 0,5µg/µl; PMSF:0,3mM
Puffer AQ CNBr-Chromatographie	10mM Tris, 2mM EDTA, 2mM Benzamidin
Puffer C CNBr-Chromatographie	0,1M Na(CH ₃ COO), 0,5M NaCl, pH 4,0
Running-Buffer SDS-PAGE 10x	30g/l Tris; 144g/l Glycin; 10g/l SDS; pH 8,3
SOB-Medium	20g Bacto Tryptone, 5g Hefe, 0,5g NaCl, 2,5ml 1M KCl, 10ml 1M MgCl ₂ , pH 7,0
SOC-Medium	1l SOB-Medium, 20ml 1M Glucose
Stripping Lösung	20ml 1M NaOH, 180ml MQ-H ₂ O, 4mg SDS, 1mg DTT
TAE-Puffer 50x (Agarose-Gel-Elektrophorese)	242g/l Tris, 57,1ml konz. Essigsäure, 100ml 0,5M EDTA (pH 8,0), ad 1l MQ-H ₂ O
TBS 10x Western Blot	24,2g/l Tris; 80g/l NaCl; pH 7,6
TBST Western Blot	TBS; 0,05% Tween-20
Tris/EDTA	1,2g/l Tris; 0,372l EDTA; pH 8,5
Tris-HCl Puffer 0,6M SDS-PAGE	60g/l Tris; 40ml 10% SDS; ad. 1l MQ-H ₂ O; pH 6,8
Tris-HCl Puffer 1,8M SDS-Page	182g/l Tris; 40ml 10% SDS; ad. 1l MQ-H ₂ O; pH 8,8

Tab. 5: Puffer und Lösungen

B.1.5 Verwendete Futtermittel

Sämtliche Futtermittel wurden von ssniff (Soest) bezogen:

Normal-Salz: Alleinfutter für Ratten- und Mäuse-Haltung mit 0,24% Natrium, Pellets

Niedrig-Salz: Natriumarm mit 0,03% Natrium, Pellets

Hoch-Salz: Natrium Exzess mit 4% Natrium, Pellets

B.2 Methoden

B.2.1 Molekularbiologische Methoden

Ein Ziel dieser Arbeit bestand darin, einen spezifischen cGKII-Antikörper zu generieren. Da vorangegangene Versuche, die cGKII in einem eukaryontischen System (Sf9-Insekten-Zellen) zu exprimieren, gescheitert sind, wurde im Rahmen dieser Arbeit versucht, das Enzym in prokaryontischen Zellen (*E. coli*) herzustellen. Um letztlich einen spezifischen Antikörper gegen die cGKII herstellen zu können, wurde als Erstes ein, möglichst wenig mit Isoformen homologes, DNA-Teilstück des Enzyms gesucht. Hierdurch werden später mögliche Kreuzreaktionen mit den anderen Isoformen vermieden. Dieses DNA-Stück (im vorliegenden Fall die N-terminale Domäne der cGKII, siehe Anhang S.125) wurde im Anschluss zunächst vervielfältigt:

B.2.1.1 Polymerase-Ketten-Reaktion

Mit Hilfe der Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) ist es möglich, bestimmte Abschnitte einer Template-DNA exponentiell anzureichern. Das zu vervielfältigende DNA-Stück wird begrenzt durch spezifische Primer, die sich upstream (5') und downstream (3') an die DNA anlagern und als Startpunkt für die Vervielfältigung durch die DNA-Polymerase dienen [193]. Ein PCR-Lauf besteht aus 20-40 Zyklen, die je drei Reaktionsschritte beinhalten: Zunächst erfolgt ein Denaturierungsschritt bei 94°C, der durch Denaturierung der Wasserstoffbrückenbindungen zur Auftrennung des DNA-Doppelstranges in 2 Einzelstränge führt. Anschließend folgen ein Primerhybridisierungsschritt (je nach Wahl der Primer 55-65°C) und letztlich ein Elongationsschritt, in welchem die Primer um die jeweilige Komplementärsequenz verlängert werden (je nach Wahl der verwendeten Polymerase bei 68-72°C).

Die Primer für die Anreicherung der N-terminalen Region der cGKII wurden so gewählt, dass im späteren Protein die Aminosäuren 4-183 exprimiert wurden [106] (exprimierte Sequenz siehe Anhang S.125). Am 5'-Ende der Primer wurde je eine Erkennungsstelle für Restriktionsendonukleasen angefügt, um die spätere Klonierung zu ermöglichen (hellgrau hinterlegt). Zusätzlich wurde beim Reverse-Primer ein Stoppcodon eingebaut, so dass die spätere Expression nach der letzten Aminosäure zum Erliegen kommt (dunkelgrau hinterlegt). Die Synthese der Primer wurde von der Firma Entelechon (Regensburg, D) durchgeführt. Die optimale Hybridisierungstemperatur wurde durch eine Gradienten-PCR ermittelt und lag bei 58,4°C.

cGKII-N-Term_for (ASf11): 5'- GCAGATCTTCAGTGAAGCCCAAGCATGC - 3' (BglII)

cGKII-N-Term_rev (ASr12): 5' - GCAAGCTTTCAGCATTCCACCATGTCCTTGAT 3' (HindIII)

Als Template-DNA diente die kodierende Sequenz der murinen cGKII, diese lag am Lehrstuhl bereits einkloniert in einem Vektor vor (murine cGKII-cDNA in pVL 1393, Vorarbeiten von Dr. Matthias Desch).

Als Polymerase wurde die Pfx-Polymerase verwendet, da diese eine sog. „proof reading“-Funktion besitzt und dadurch hoch akkurat arbeitet (3'-5'-Exonuclease-Aktivität). Hierdurch wurde das Risiko, dass fehlerhafte Nucleotide eingebaut wurden und damit Sequenzmutationen entstehen, minimiert.

PCR-Ansatz:

Template DNA (5ng)	1µl
Pfx Amplifikations-Puffer 10x	5µl
dNTP (25mM)	1,25µl
MgSO ₄ (25mM)	1µl
For-Primer (25mM)	1µl
Rev-Primer (25mM)	1µl
Pfx-Polymerase (2,5U/µl)	0,4µl

PCR-Programm:

	°C	t	29
Initiale Denaturierung	95	5'	
Denaturierung	95	30"	
Annealing	58,4	30"	
Elongation	68	1'	
finale Elongation	68	10'	
Pause	4	∞	

Neben der Vervielfältigung des N-terminalen Bereichs der cGKII wurde auch die Mausgenotypisierung standardisiert mittels PCR durchgeführt. Ein entsprechendes Protokoll findet sich im Anhang dieser Arbeit (siehe S. 124).

B. 2.1.2 Agarose-Gelelektrophorese

Im Anschluss an die PCR-Läufe wurde eine Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt, um die angereicherte DNA von den restlichen Bestandteilen des PCR-Ansatzes abzutrennen und die korrekte Größe zu überprüfen. Hierbei macht man sich zu Nutze, dass das negativ geladene Zucker-Phosphat-Rückgrat einer DNA im elektrischen Feld wandert und damit unter Verwendung einer geeigneten Trägermatrix wie Agarose anhand ihrer Größe aufgetrennt werden kann. Durch den Basen-interkalierenden Farbstoff Ethidiumbromid wird das farblose DNA-Molekül unter UV-Licht sichtbar gemacht.

Abhängig von der Größe des erwarteten DNA-Fragments wurden unterschiedliche prozentuale Anteile Agarose verwendet. Diese wurde in TAE-Puffer unter Erwärmen gelöst und nach Abkühlen der Lösung auf ca. 60°C mit 2µl Ethidiumbromid-Lösung (10mg/ml in H₂O) pro 100ml Gel versetzt. Anschließend wurde die Lösung in Gelkammern gegossen, ein Kamm zur Ausformung von Taschen eingesetzt und das fertige Gel bis zum vollständigen Auskühlen im Dunkeln bei RT gelagert. Nachfolgend wurden ein Größenstandard (10µl) sowie 20µl der

zunächst mit 5x DNA-Loading-Puffer versetzten PCR-Proben in die Geltaschen pipettiert. Der Gellauf erfolgte bei 120-140V für ca. 30-60min in TAE-Puffer. Schließlich wurde die erfolgreiche Auftrennung am UV-Transilluminator überprüft. Für die weiterführenden Schritte wurden Banden der richtigen Größe mithilfe eines Skalpell ausgeschnitten und mittels eines Gel-Extraktionskits die DNA wieder von der Agarose abgetrennt. Die Gel-Extraktion wurde hierbei analog Herstellerangaben durchgeführt. Die erhaltene DNA-Konzentration wurde am Qubit-Photometer vermessen.

B.2.1.3 Klonierung

Bei der Klonierung handelt es sich um verschiedene Arbeitsschritte, bei welchen ein DNA-Fragment (Insert) in einen Vektor eingesetzt wird. Hierbei werden die zu integrierende DNA-Sequenz und der Vektor zunächst in einem Restriktionsverdau geschnitten, anschließend zusammengebracht und ligiert und der fertige Vektor schließlich durch Transformation in Bakterienzellen eingebracht. Neben der Insert-DNA ist die Wahl eines geeigneten Vektors von entscheidender Bedeutung für die weitere Vorgehensweise. Im Rahmen dieser Arbeit wurde mit dem pRSET-System (die Auswahl des Subtyps ist abhängig vom reading frame; hier pRSETB) gearbeitet (siehe Abb. 7). Dieses Vektor-System bietet neben den allgemein wichtigen Merkmalen alle nötigen DNA-Sequenzen für die spätere Expression von Proteinen (Ribosomen-Bindestelle (RBS), Startcodon (ATG), „multiple cloning site“). Weiterhin ist nach dem Startcodon die Sequenz für einen sog. His-Tag hinterlegt, einem wichtigen Tool bei der späteren Aufreinigung des exprimierten Proteins (siehe S.38).

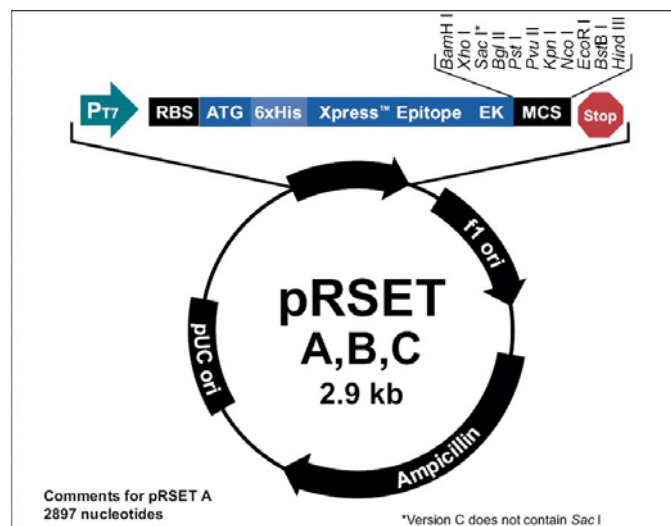


Abb. 7: Vektorkarte pRSET-Expressionsvektor

B.2.1.3.1 Restriktionsverdau und Ligation

Restriktionsendonukleasen (REN) sind in Bakterien und Archäen vorkommende Enzyme, welche DNA-Doppelstränge an unterschiedlichen Erkennungsstellen spezifisch erkennen und den Zucker-Phosphat-Backbone nachfolgend an einer bestimmten Stelle hydrolysieren. Die Erkennungs-Sequenzen der REN bestehen meist aus palindromischen Sequenzabschnitten von 6-8bp, bei der Mehrzahl der verschiedenen REN erfolgt die Hydrolyse innerhalb dieser Erkennungs-Stellen (Typ II-REN). Hierbei kann der Schnitt entweder glatt (blunt ends) oder versetzt bzgl. des DNA-Doppelstranges (sticky ends) erfolgen.

Werden Insert und Vektor mit der gleichen REN oder einem Isoschizomer geschnitten, kann anschließend die Ligation beider DNA-Sequenzen stattfinden. Hierbei katalysiert eine Ligase die Ausbildung einer Phosphodiester-Bindung zwischen Vektor und Insert.

In dieser Arbeit wurde für die präparativen Restriktionsverdaus zur Klonierung sowohl für Insert als auch für Vektor eine Kombination aus 2 Restriktionsenzymen (BglIII, HindIII) verwendet, da hiermit eine gerichtete Ligation möglich ist. Weiterhin wurde BamHI in einem qualitativen Restriktionsverdau zur Kontrolle der Ligation eingesetzt. Die Unterscheidung präparativ/qualitativ beruht auf der jeweils eingesetzten DNA-Menge (0,5µg DNA bzw. 2,5µg DNA). Für BglIII wurde jeweils die doppelte Menge eingesetzt, da dieses Enzym im gewählten Puffer nur 75% Aktivität zeigt.

Präparativer Restriktionsverdau:

Template DNA	2,5µg
NEB-Puffer 2 (10x)	5µl
HindIII (20U/µl)	2,5µl
BglIII (20U/µl)	5µl
H ₂ O	ad 50µl

qualitativer Restriktionsverdau:

Template DNA	0,5µg
NEB-Puffer 2 (10x)	1,5µl
BSA (1mg/ml)	1,5µl
BamHI(20U/µl)	0,5µl
H ₂ O	ad 15µl

Die Ansätze wurden jeweils 2h bei 37°C in einem Thermoschüttler durchgeführt. Beim Verdau des Vektors wurde zusätzlich nach 1h 2µl SAP (Shrimp Alkaline Phosphatase, 1000U/ml) zugegeben, um das offene 5'-Ende zu dephosphorylieren und damit eine Re-Zirkularisierung des Leer-Vektors bei der Ligation zu verhindern. Nach der Inkubation wurde der Verdau durch Zugabe von DNA-Loading-Puffer gestoppt, auf ein Agarose-Gel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt. Die erhaltenen Banden wurden anschließend ausgeschnitten und mittels eines Gel-Extraktionskits aufgereinigt. Schließlich wurden die Konzentrationen von geschnittenem Vektor und Insert am Qubit bestimmt und die einzusetzenden DNA-Mengen für die anschließende Ligation berechnet (Vektor:Insert-Verhältnis: 1:12, 50µg und 100µg). Die Ligation erfolgte mithilfe je 1µl T4-DNA-Ligase (400U/µl) und entsprechendem mitgelieferten Puffer in einem Gesamtansatz von 20µl (aufgefüllt mit H₂O_{bidest}) durch üN-Inkubation bei 16°C

und 600rpm. Anschließend wurde die Reaktion durch eine 10-minütige Hitzeinaktivierung bei 65°C abgestoppt, die DNA-Konzentration am Qubit vermessen und 2-10ng des Ansatzes in der Transformation eingesetzt.

B.2.1.3.2 Herstellung kompetenter Bakterien und Transformation

Unter dem Begriff Transformation versteht man die nicht-virale Übertragung von DNA (in diesem Fall eines Vektors) hauptsächlich in Bakterienzellen. E.coli ist natürlicherweise nicht dazu in der Lage, freie DNA aus dem umgebenden Medium aufzunehmen, weshalb zunächst chemisch-kompetente Zellen hergestellt werden müssen. Hierbei sorgt eine Behandlung mit CaCl_2 für höhere Durchlässigkeit der Plasmamembranen der Zellen [90].

Bei dem im Rahmen dieser Arbeit verwendeten E.coli-Stamm handelt es sich um BL21(DE3)pLysS (Merck, Darmstadt, D), einen speziell für Expressionsversuche geeigneten Stamm. Zunächst ist der Stamm defizient bzgl. verschiedener Proteasen, so dass die Protein-Degradation vermindert wird. Des Weiteren besitzt dieser Stamm eine chromosomale Kopie des T7-RNA Polymerase-Gens unter Kontrolle eines IPTG-induzierbaren Promotors, um die bakterielle Expression des gewünschten Proteins mittels IPTG um ein Vielfaches zu steigern. Das pLys-Plasmid kodiert das T7-Lysozym, ein Enzym, welches die basale, nicht-IPTG-induzierte T7-RNA-Polymerase-Aktivität hemmt. Damit das Plasmid nicht während der Zellteilungen bei Flüssigkulturen oder auf Agar-Platten verloren geht, wird den Anzucht-Medien standardmäßig ein Antibiotikum zugefügt, um den Selektionsdruck zu erhöhen. Welches Antibiotikum gewählt wird, ist abhängig von dem jeweiligen Resistenz-Gen, welches zusätzlich vom Plasmid kodiert wird. Beim pLysS-Plasmid handelt es sich hierbei um eine Chloramphenicol-Resistenz (CAM), so dass sämtlichen Medien/Agarplatten 35µg/ml Chloramphenicol zugesetzt wurde.

Aus einem Glycerolstock von E.coli BL21(DE3)pLysS wurde zunächst eine 5ml üN-Schüttelkultur (ÜNK) in LB-Medium angeimpft. Mit 2ml der ÜNK wurden am Folgetag 200ml LB-Medium inokuliert und bei 37°C und 200rpm bis zu einer OD_{600} von ca. 0,2 geschüttelt. Die Bakteriensuspension wurde auf 4 50ml Falcon-Tubes aufgeteilt und nach 10-minütiger Inkubation auf Eis anschließend abzentrifugiert (7min, 4000g, 4°C). Nach Abdekantierung des Überstands wurden die Zellen mit je 8ml eiskalter CaCl_2 -Lösung resuspendiert, 30min auf Eis inkubiert und wiederum bei gleichen Bedingungen zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, die Bakterienpellets in 1,6ml eiskalter CaCl_2 -Lösung erneut resuspendiert und aliquotiert (100-200µl). Schließlich wurden die derart vorbehandelten Bakterien-Aliquots 2h auf Eis gelagert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Transformation bei -80°C gelagert.

Die derart vorbereiteten Zellen wurden für die eigentliche Transformation zunächst bei RT erwärmt, bis die Zellsuspension zu tauen anfang und dann 10min auf Eis gestellt. Zu 100µl Zellsuspension wurden im Anschluss 2-10ng des ligierten pRSETB-N-Term-Vektors pipettiert und weitere 30min auf Eis inkubiert. Nachfolgend wurde ein sog. „Hitzeschock“ durchgeführt, indem die Zellen für 1min auf 42°C erhitzt und sofort danach wieder für 3min auf Eis gekühlt wurden. Danach erfolgte die Zugabe von 900µl sterilem SOC-Medium und eine einstündige Inkubation bei

37°C unter Schütteln, wobei das Cup liegend auf dem Schüttler angebracht wurde. Schließlich wurden 100µl der Bakterien mittels eines Drygalskispatels auf vorgegossene LB-Agar-Platten (Protokoll siehe Anhang S.124) ausgestrichen und üN bei 37°C kultiviert. Die Agarplatten enthielten neben CAM als Selektions-Antibiotikum zusätzlich Ampicillin (200µg/ml), um selektiv nur pRSETB-N-Term-haltige Bakterien zu vermehren.

Am Folgetag wurden die Agarplatten hinsichtlich gewachsener Kolonien überprüft und anschließend von 5 verschiedenen Klonen je eine 5ml-üN-Kultur angelegt, mit der im Anschluss mittels Mini-Prep zunächst die enthaltenen Plasmide aufgereinigt wurden.

B.2.1.3.3 Gewinnung von Plasmid-DNA mittels Mini/Maxi-Prep und anschließende Sequenzierung

Zur Gewinnung von Plasmid-DNA aus Bakterienkulturen werden heutzutage hauptsächlich Kits, sog. Mini- bzw. Maxipreps, verwendet. Hier werden die Bakterienzellen zunächst alkalisch lysiert, die Plasmid-DNA im Anschluss in einer Säule an eine spezielle Membran gebunden und nach mehreren Waschschritten durch einen Elutionspuffer oder auch DEPC-H₂O wieder eluiert. Abhängig vom Größenmaßstab der aufzureinigenden Bakterienkultur kommen Mini- (bis 5ml Kultur) oder Maxipreps (bis 250ml Kultur) zum Einsatz.

Aus den verschiedenen ÜNKs wurden zunächst Glycerinkulturen angelegt (700µl Kultur + 300µl steriles 50%-iges Glycerin (v/v)) und bei -80°C gelagert. Anschließend wurde mit den restlichen Ansätzen eine Mini-Prep analog Herstellerangaben durchgeführt, die Vektor-DNA mit 50-100µl DEPC-H₂O eluiert und die Konzentration am Qubit bestimmt. Durch Restriktionsverdau-Analysen wurde zunächst kontrolliert, ob der Vektor das N-Terminus-Insert überhaupt enthält und ob dieses in der richtigen Orientierung vorliegt. Im Anschluss wurde von einem der Klone (Klon 3) aus der Glycerin-Kultur eine große üN-Schüttelkultur (250ml) angelegt und diese anschließend mittels MaxiPrep aufgereinigt. Die erhaltene Vektor-DNA wurde zur Sequenzanalyse des Inserts bei der Firma Entelechon eingereicht (Sequenzierprimer: T7-Prom und T7-Term) und die erhaltene Sequenz abschließend mittels der DNA-Analysesoftware DNAMAN mit der erwarteten Sequenz verglichen. Hiermit wurde sichergestellt, dass der Vektor die korrekte Sequenz enthält und während des Klonierungsprozesses und anschließender Schritte keine Mutationen aufgetreten sind.

B.2.1.4 Protein-Expression in E.coli

Bei der bakteriellen Expression rekombinanter Plasmide gibt es eine Reihe Parameter zu optimieren, um letztlich akzeptable Proteinmengen für die spätere Immunisierung zu erhalten. Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene Versuchs-Parameter für die Expression des cGKII-N-Terminus in E.coli einer näheren Betrachtung unterzogen, unter anderem verwendeter Klon, IPTG-Konzentration und Induktionszeitpunkt, Versuchsdauer und Versuchstemperatur. Das hier angegebene Protokoll berücksichtigt alle Optimierungen.

Sämtliche zur Expression nötigen Expressionen wurden bei 37°C durchgeführt. Als Antibiotikazusätze in Medien/Agarplatten wurden Chloramphenicol (35µg/ml) und Ampicillin (200µg/ml) verwendet. Medien und LB-Agar wurden im Vorfeld nach Standardbedingungen autoklaviert und damit sterilisiert.

Zunächst wurden mittels einer aus dem Glycerolstock von Klon 3 frisch auf Agarplatten kultivierten Einzelkolonie 100ml LB-Medium angeimpft und üN bei 37°C unter leichtem Schütteln inkubiert. Tags darauf wurde die ÜNK 1:25 auf 250ml frisches, vorgewärmtes LB-Medium verdünnt und weitere 2-3h bis zur beginnenden Trübung bebrütet (Präkultur). Diese Präkultur wurde anschließend in vier 2l-Kolben auf je 500ml vorgewärmtes LB-Medium erneut verdünnt (1:50) und unter Schütteln weiter inkubiert, bis eine OD₆₀₀ von 0,5 erreicht war. Sodann wurde die Expression des cGKII-N-Terminus durch Zugabe von 1mM IPTG in den Bakterien induziert. Nach weiteren 6h wurden die finale OD₆₀₀ und der pH-Wert der vier Schüttelkulturen gemessen und die Zellen durch Zentrifugation (10min, 4500rpm, 37°C) geerntet. Schließlich wurde das Feuchtgewicht der Bakterienpellets bestimmt und diese bis zur Proteinaufreinigung bei -20°C gelagert.

B.2.2 Proteinbiochemische und immunologische Methoden

Nachdem im vorangegangenen Teil die molekularbiologischen Methoden, die angewandt wurden, um den cGKII-N-Terminus als Target zur Antikörper-Generierung herzustellen, vorgestellt wurden, soll der folgende Teil die proteinbiochemischen Methoden, die hierzu nötig waren, näher beleuchten. Zunächst wurden die erhaltenen Bakterienpellets aufgeschlossen und mittels Affinitätschromatographie aufgereinigt.

B.2.2.1 Aufreinigung von Protein mittels Ni-NTA- Affinitätschromatographie und Aufkonzentrierung

Affinitätschromatographische Trennverfahren beruhen auf der reversiblen Interaktion zwischen Proteinen und Liganden, welche gekoppelt an einer Matrix vorliegen. Je nach Wahl des Liganden ist diese Interaktion meist sehr spezifisch, so dass diese Methode eine saubere Abtrennung des gewünschten Proteins von restlichen Zellbestandteilen erlaubt. Durch die Wahl von pRSETB als Expressionsvektor beinhaltet die Proteinsequenz des exprimierten Proteins N-terminal einen sog. His-Tag. Diese, aus sechs Histidin-Resten bestehende Markierung bindet u.a. mit hoher Affinität an komplexierte bivalente Nickel-Ionen (Ligand); kommerziell sind Nickel-Säulen bzw. Matrices zum Selbstpacken mit unterschiedlichen Chelatliganden erhältlich. Zur Elution des Proteins wird meist Imidazol in unterschiedlichen Konzentrationen verwendet. Dieses bindet mit einer höheren Affinität als der His-Tag an den Nickelkomplex, so dass das gewünschte Protein verdrängt und damit ausgewaschen wird. Ähnlich wie bei der Proteinexpression ist auch die Aufreinigung von diversen Parametern abhängig. In dieser Arbeit wurden unterschiedliche Parameter, wie z.B. Chelatbildner und Konzentration von Imidazol im Waschpuffer bzw. im Elutionspuffer ausgetestet. Das finale Protokoll beinhaltet diese Optimierungen.

Alle Arbeiten wurden bei 4°C durchgeführt, um eine Degradation des Proteins während der Aufreinigung möglichst zu vermeiden. Zusätzlich wurden sämtlichen Puffern Protease-Inhibitoren (PI zugesetzt (Leupeptin: 0,5µg/ml, PMSF: 300µM, Benzamidin: 1mM).

Zunächst wurde das Säulenmaterial vorbereitet. Hierzu wurde 1ml Ni²⁺-NTA-Matrix abzentrifugiert, einmal mit 2ml LEW-Puffer gewaschen, erneut abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Die aus der Large-Scale-Expression erhaltenen Bakterienpellets wurden mit je 5ml LEW-Puffer + 10µg/ml Lysozym versetzt und 30min auf einem Magnetrührer gerührt. Im Anschluss an diesen enzymatischen Aufschluss wurden die Zellen zusätzlich physikalisch mit gepulsten Ultraschallwellen (3x20s, 70% Nutzleistung, mit je 1min Pause zwischen den Intervallen) unter Eiskühlung aufgeschlossen. Unlösliche Zellbestandteile wurden mittels Zentrifugation (30min, 5000g, 4°C) abgetrennt und der Protein-haltige Überstand (Zelllysate) auf die vorbereitete Ni²⁺-NTA-Matrix gegeben. Während einer 60-minütigen Inkubation unter leichtem Schütteln (200rpm) kam es im Folgenden zur Ausbildung des Ligand-Protein-Komplexes. Das Matrix-Protein-Gemisch wurde anschließend in 5ml PP-Plastiksäulen (Quiagen, Hilden, D) gefüllt und der erste Flow-Through gesammelt. Nach 8 Waschschritten mit je 2ml LEW-Puffer + Imidazol (mit gradieller Erhöhung der Imidazolkonzentration von 10mM, 20mM, 40mM und restliche 5 Waschschrritte 80mM) wurde schließlich eluiert. Als Elutionspuffer wurde LEW-Puffer +150mM Imidazol verwendet, es wurden drei Fraktionen mit je 1,5ml Eluat gesammelt. Schließlich wurden je 10µl der Wasch- und Elutionsfraktionen mittels SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennt und hinsichtlich Proteingehalt weiter charakterisiert.

Nach erfolgter Reinheitskontrolle wurden die Eluate der 4 Maxi-Expressionsansätze (je 500ml) in Vivaspin-Aufkonzentrierungssäulen gefüllt und das Volumen mittels Zentrifugation bei 4000g, 4°C (15-30min) von insgesamt 18ml (4 Ansätze, je 3 Elutionsfraktionen à 1,5ml) stufenweise eingeeengt. Die Proteinlösung wurde dreimal mit je 5ml EK-Puffer gewaschen, um die Imidazolkonzentration zu erniedrigen und schließlich auf ca. 2ml aufkonzentriert. Zuletzt wurde die Proteinkonzentration am Qubit bestimmt.

B.2.2.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Bei der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Laemmli [133] handelt es sich um ein Verfahren zur Auftrennung von Protein-Gemischen. Proteine binden das anionische Detergens Natriumdodecylsulfat (SDS). Hierdurch werden die Eigenladungen im Molekül überlagert, insgesamt resultiert eine negative Gesamtladung, so dass eine gerichtete Wanderung im elektrischen Feld gewährleistet ist. Die Anzahl der gebundenen SDS-Moleküle ist proportional zum Molekulargewicht der Proteine, womit diese abhängig von ihrer Größe aufgetrennt werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden 10-14%ige PA-Gele als Trenngele verwendet (vgl. Tab. 6). Diese wurden zunächst gegossen, nach dem Auspolymerisieren mit Sammelgel überschichtet und ein Kamm zur Taschenformung eingesetzt. Nach dem Aushärten wurden die Gele in die Elektrophorese-Kammer eingespannt und mit 1x Running Buffer aufgefüllt. Die zu separierenden Proteinproben (50-100µg, Proteinkonzentration am Qubit vermessen) wurden zunächst je nach

B. Material und Methoden

Konzentration mit 2x bzw. 6x Laemmli Puffer versetzt und mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ auf max. 20 μl aufgefüllt. Anschließend erfolgte ein Denaturierungsschritt im Thermomixer (95°C, 3min, 300rpm). Schließlich wurden die Proben neben einem Proteinstandard-Marker in die Geltaschen pipettiert und der Gellauf bei 100V gestartet, bis die Proben das Sammelgel durchlaufen hatten (ca. 30min). Die Elektrophorese wurde bei 150V fortgesetzt, bis der Proteinstandard-Marker sauber aufgetrennt und die Laufront am unteren Ende des Gels angekommen war.

Zur Auftrennung von kleinen Proteinen (5-30kDa) kamen weiterhin Sonderformen der SDS-PAGE, sog. Tricin-Gele zum Einsatz [200]. Durch Verwendung von Tricin wird die Ionenstärke im Gel erhöht, was zu einer verlangsamten Protein-Wanderung führt. Hierbei befindet sich zwischen der Sammel- und der Trenngelschicht noch eine weitere sog. Spacerschicht. Eine Rezeptur für Tricin-Gele findet sich in Tab. 7. Der Gellauf erfolgte zunächst für 60min bei 30V, bis der Marker die Spacerschicht durchlaufen hatte.

	Trenngel 10%	Trenngel 11,5%	Trenngel 14%	Sammelgel 5%
$\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$	7,3ml	6,5ml	5,1ml	3,6ml
30% Acrylamid/ 0,2% Bisacrylamid	5,7ml	6,5ml	7,9ml	0,83ml
Tris-HCl-Puffer 1,8M, pH=8,8	3,6ml	3,6ml	3,6ml	-
Tris-HCl-Puffer 0,6M, pH=6,8	-	-	-	0,5ml
10% SDS	167 μl	167 μl	167 μl	50 μl
TEMED	20 μl	20 μl	20 μl	10 μl
10% APS	200 μl	200 μl	200 μl	50 μl

Tab. 6: Zusammensetzung SDS-Polyacrylamidgele

	Trenngel 16,5%	Spacergel	Sammelgel
$\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$	-	1,3ml	3,7ml
24,25% Acrylamid/ 0,75% Bisacrylamid	5ml	2ml	1ml
Glycerin	1ml	-	-
Tricin-Gel-Puffer	2,5ml	1,6ml	1,55ml
TEMED	7 μl	6 μl	12 μl
10% APS	45 μl	20 μl	60 μl

Tab. 7: Zusammensetzung Tricin-SDS-Polyacrylamidgele

B.2.2.3 Coomassie-Färbung

Nach einer SDS-PAGE stehen verschiedene Möglichkeiten zur Wahl, um die aufgetrennten Proteine sichtbar zu machen. Eine relativ einfache Methode ist hierbei die Coomassie-Färbung. Hierbei wird das Gel in der Coomassie-Färbelösung inkubiert, wobei sich der Farbstoff (Coomassie-Brilliant-Blau G-250) an basische Aminosäure-Seitenketten anlagert und damit zu einer unspezifischen Blaufärbung der Proteine in einem PA-Gel führt.

Das zu färbende Gel wurde nach dem Gellauf zunächst kurz in $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ gespült und danach mit der Coomassie-Färbelösung ca. 10min bei RT unter Schütteln inkubiert. Anschließend wurde das Gel mit Entfärbelösung behandelt, bis sich der Hintergrund nahezu komplett entfärbt hatte (ca. 1h, mehrfacher Pufferwechsel).

B.2.2.4 Western Blot

Eine weitere Möglichkeit, die aufgetrennten Proteine nachzuweisen, besteht in der immunologischen Detektion mittels Antikörpern. Bei einem sog. Western Blot ist sowohl die qualitative als auch mittels Densitometrie die quantitative Analyse eines ausgewählten Proteins möglich. Hierbei werden die aufgetrennten Proteine elektrisch auf eine Träger-Membran transferiert. Als Träger kommen verschiedene Materialien zum Einsatz. PVDF (Polyvinylidenfluorid) bindet die transferierten Proteine aufgrund hydrophober und polarer Wechselwirkungen, im Vergleich zu anderen Materialien wie z.B. Nitrocellulose ist die Haltbarkeit von PVDF-Membranen ein entscheidender Vorteil. Nach dem Transfer können ausgewählte Proteine mithilfe von spezifischen primären Antikörpern, die gegen entsprechende Epitope des gesuchten Proteins gerichtet sind und anschließender Inkubation mit Sekundär-Antikörpern, welche gegen den Fc-Teil des primären Antikörpers gerichtet sind und eine Reportergruppe (z.B. Fluoreszenz-Farbstoffe) oder ein Reporterenzym (z.B. horse-radish-peroxidase, HRP) tragen, nachgewiesen werden. Bei der Verwendung von HRP-gekoppelten Antikörpern werden die Proteine mittels Chemilumineszenz (enzymatische Oxidation von Luminol (3-Aminophthylsäure-Hydrazid) durch H_2O_2 unter Freisetzung von Lichtquanten) und anschließender photochemischer Fixierung auf einem Photofilm sichtbar gemacht.

Der Proteintransfer wurde mithilfe eines Semi-Dry-Systems [132] durchgeführt. Hierzu wurden Filterpapiere und eine PVDF-Membran auf die Größe des Gels zugeschnitten und nach folgender Reihenfolge luftblasenfrei auf die Anodenplatte der Blottingapparatur aufgeschichtet:

- 3 Filterpapiere mit Anodenpuffer 1 getränkt
- 2 Filterpapiere mit Anodenpuffer 2 getränkt
- PVDF-Membran mit Methanol hydrophilisiert
- Gel mit Anodenpuffer 2 benetzt
- 5 Filterpapiere mit Kathodenpuffer getränkt

Anschließend wurde die Graphit-Deckplatte (Kathode) der Blotting-Apparatur aufgesetzt und beschwert. Der elektrische Transfer der Proteine erfolgte bei 60mA pro Gel ($0,8\text{mA}/\text{cm}^2$) für 60min. Tricingele wurden gleichermaßen, jedoch über 75min geblottet.

Um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen, wurde die Membran anschließend für 1-2h in 5% Milchpulver in TBST-Puffer bei RT geschwenkt. Nach dreimaligem Waschen mit TBST-Puffer für je ca. 5min wurde die Membran ggf. zur gleichzeitigen Detektion verschiedener Proteine auf Höhe der zu erwartenden Banden zerschnitten und üN bei 4°C mit den entsprechenden Antikörperverdünnungen (siehe Tab. 4, S.30) in 3% BSA/0,05% NaN₃ in TBST unter Schütteln inkubiert. Am Folgetag wurden unspezifisch gebundene Antikörper abgewaschen (dreimal 5min mit 1% Milchpulver in TBST) und die Membran bei RT in der zum Primär-Antikörper passenden Sekundär-Antikörperverdünnung (siehe Tab. 4, S.30) in 1% Milchpulver in TBST für 2h geschüttelt. Schließlich erfolgten wiederum drei Waschschrte mit TBST, um unspezifische Hintergrundfärbung möglichst zu minimieren. Für die Chemilumineszenz-Reaktion wurde ca. 1ml Luminolreagenz (bestehend aus Peroxidlösung und Luminol Enhancer-Lösung) aufpipettiert und ca. 3min inkubiert. Die Membran wurde abschließend zwischen zwei Kopierfolien in eine lichtundurchlässige Entwicklerkassette gelegt und bei Rotlicht in der Dunkelkammer ein Chemilumineszenz-Film aufgelegt (Tab. 3). Die Belichtungszeit variierte hierbei je nach verwendetem Antikörper zw. 2s und 30min. Zuletzt wurde der Film mithilfe des Cawomat 2000 IR entwickelt.

Sollten mehrere verschiedene Proteine derselben Größe auf der gleichen Membran detektiert werden, so wurden die primären und sekundären Antikörper mittels „Stripping“ entfernt. Hierzu wurde die Membran für ca. 20min bei RT in ca. 30ml Stripping-Lösung geschüttelt. Nach zweimaligem Waschen mit TBST wurde die Membran analog der ersten Immundetektion blockiert und mit weiteren Antikörpern inkubiert. Densitometrische Analysen erfolgten mittels Image-J. Die erhaltenen Bandenintensitäten wurden zunächst auf β -Actin und anschließend auf den jeweiligen, ebenfalls auf β -Actin normalisierten, sham-Kontrollwert derselben Membran bezogen.

B.2.2.5 Immunisierung von Kaninchen

Nachdem die Expression bzw. Aufreinigung des rekombinanten cGKII-N-Terminus mittels Coomassie-Färbung und Western Blot überprüft worden war, wurde die Proteinlösung zur Immunisierung von Kaninchen an die Firma Davids Biotechnologie GmbH (Regensburg, D) weitergereicht. Dort wurde 3 Kaninchen bei 5 Immunisierungen im Abstand von je 2 Wochen insgesamt 0,2-0,5mg Protein pro Tier injiziert. Letztlich wurde das Serum gewonnen (pro Kaninchen ca. 50ml) und ein ELISA zur Titerbestimmung durchgeführt. Anschließend wurden die Seren zurück an den Lehrstuhl geschickt. Zunächst wurde mithilfe von Tricin-Gelen im Western Blot überprüft, ob das Antigen erkannt wird (Beladung des Gels mit 10 bzw. 100ng) und weiterführend, ob die Erkennung auch in murinen Gewebeproben erfolgt.

B.2.2.6 Gewinnung von Protein aus Mausgeweben und cGMP-Agarose-Fällung

Um Proteinproben für weiterführende Analysen zu erhalten, wurden Mäuse zunächst retrograd perfundiert (siehe S.48), die Nieren bzw. ein Teil des Jejunums entnommen, die Nierenkapsel entfernt, und die Organe in kaltem PBS gespült, um Blutreste und Kot auszuspülen. Anschließend wurden die Gewebe zur Unterbindung der Proteolyse möglichst zeitnah in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Für den Gewebeaufschluss erfolgte zunächst die mechanische Zerkleinerung in einem selbstgebauten, mit flüssigem Stickstoff vorgekühlten Metallhomogenisator, bevor die Proben mit Lubrolpuffer mit Proteaseinhibitoren (PI; Leupeptin: 0,5µg/ml, PMSF: 300µM, Benzamidin: 1mM) und PhosStop versetzt wurden. Die verwendete Puffermenge variierte je nach Organgewicht (ca. 3-4ml/g Organ). Durch die Verwendung eines Detergens (Lubrol) wurden auch membrangebundene Proteine, zu denen die cGKII gehört, solubilisiert. Anschließend wurden die Proben mit einem Ultra-Turrax homogenisiert (3 x 15s auf Eis, dazwischen mind. 20s Pause). Die Homogenate wurden schließlich zweimal für je 20min bei 18000g und 4°C abzentrifugiert, um Zellorganellen und nicht homogenisierte Zellen abzutrennen und der Überstand nach Aliquotieren bei -80°C tiefgefroren. Im Anschluss wurden die Gewebeproben entweder direkt mittels SDS-PAGE (siehe S.39) elektrophoretisch aufgetrennt oder die cGKII vor der Auftrennung zunächst angereichert. Hierbei wurde eine kommerziell erhältliche Agarose-Matrix verwendet, an welche über einen Linker (Ethanolamin) cGMP gekoppelt wurde. Die spezifische Bindung von Proteinen mit cGMP-bindenden Struktur-Domänen erfolgte hierbei nach dem Prinzip der Affinitätschromatographie (siehe S.38). Zunächst wurde das Gewebelysat (500-1000µg Protein) mit Lubrolpuffer + PI auf 500µl aufgefüllt und unter mehrmaligem Invertieren 20min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde die Probe abzentrifugiert (18000g, 20min, 4°C). Währenddessen erfolgte die Vorbereitung der Agarose; pro Fällung wurde jeweils ca. 35µl Agarose-Suspension verwendet. Diese wurde zunächst dreimal mit Lubrolpuffer gewaschen und abzentrifugiert (10000g, 2min, 4°C). Der Überstand des vorbereiteten Gewebelysats wurde auf die gewaschene Agarose pipettiert und üN bei 4°C im Überkopfschüttler inkubiert. Am Folgetag erfolgten wiederum drei Waschschrte mit Lubrol, um ungebundene Proteine zu entfernen. Gebundene Proteine wurden schließlich mit 20µl 2fach Laemmli von der Agarose eluiert, im Thermomixer denaturiert und auf ein SDS-Gel aufgetragen.

B.2.2.7 Aufreinigung von Antikörpern mittels CNBr-Affinitätschromatographie und Depletion

Die Verwendung von unaufgereinigtem Serum in immunologischen Nachweisverfahren wie z.B. Western Blot ist aufgrund der Vielzahl unterschiedlicher Antikörper, die zusätzlich zum gewünschten Antikörper im Serum vorliegen häufig nur eingeschränkt möglich. Um die Spezifität des Antikörpers zu erhöhen, ist es meist nötig, den gewünschten Antikörper zunächst mit affinitätschromatographischen Methoden (siehe S.38) aufzureinigen. Hierbei wird das für die

Immunisierung verwendete Antigen über primäre Aminogruppen an Bromcyan-aktivierte Sepharose (eine spezielle Agarose) gekoppelt [181]. Durch die spezifische Antigen-Antikörper-Bindung kann anschließend der gewünschte Antikörper von den restlichen Serumbestandteilen abgetrennt werden und somit eine reinere Antikörperlösung hergestellt werden. Weiterhin hat man die Möglichkeit, die Spezifität einer Antikörperlösung durch Depletion zu verbessern. Hierbei wird die Lösung mit KO-Gewebe inkubiert und somit unspezifische Antikörper abgefangen.

Alle Schritte erfolgten bei 4°C. Zunächst wurde 1,5g CNBr-aktivierte Sepharose 4B etappenweise mit 400ml 1mM HCl auf einer G3-Fritte ca. 15min gespült, um Additive, die im Auslieferungszustand an der Sepharose haften, auszuwaschen. Der niedrige pH-Wert ist hierbei notwendig, um eine Hydrolyse der reaktiven Gruppen zu vermeiden. Im Anschluss wurde mit 25ml Kopplungspuffer nachgespült und das Sepharose-Gel mit 5mg des exprimierten und aufgereinigten Antigens (ggf. zuvor gegen Kopplungspuffer dialysiert; 1l Puffer/mg Protein) gemischt. Für die Ligandenkopplung wurde das Gemisch 2h bei RT mit 200rpm geschüttelt. Nachfolgend wurde das Gel zur Entfernung von überschüssigem Antigen fünfmal abwechselnd mit je 10ml Kopplungspuffer bzw. Puffer C auf einer G3-Fritte gewaschen. Um restliche reaktive Gruppen zu blockieren, wurde das Gel anschließend mit 10ml 0,2M Glycin versetzt und wiederum 2h bei RT mit 200rpm geschüttelt. Die nachfolgenden Waschschrte zur Entfernung des Glycins erfolgten analog oben. Von jedem Durchfluss wurde ein 1ml Aliquot entnommen und die OD₂₈₀ bestimmt, so dass anschließend die Kopplungseffizienz berechnet werden konnte. War diese zufriedenstellend (>80%), wurde die Säule mit 1-2l Puffer AQ gepackt und äquilibriert (üN, 1l Puffer AQ, Fluß: 1ml/ml, Pharmacia LKB 5ml, Uppsala, SE). Zur Antikörperaufreinigung wurde jeweils dreimal 5ml Serum mit 5ml Puffer AQ vermischt und die Säule nacheinander beladen. Im Anschluss erfolgten 2 Waschschrte (100ml Puffer AQ, 50ml 10mM KPO₄ pH=6,8) sowie die Elution der Antikörper mit 50ml 100mM Glycin/HCl, pH=2,5. Die Fraktionen wurden wie folgt zur Neutralisierung in mit 20% KPO₄ pH=8,0 vorbereiteten Röhrchen gesammelt: 2 x 3ml Vorlauf, 8 x 5ml Hauptfraktionen, 3 x 5ml Nachfraktionen. Nach der Proteinbestimmung wurden ausgewählte Eluate schließlich gegen das 100fache Probenvolumen Puffer A + Benzamidin bei dreifachem Pufferwechsel für 2-3 Tage dialysiert, mit 0,05% NaN₃ versetzt, im Western Blot analysiert und bei 4°C gelagert. Die Säule wurde mit 2-3l AQ-Puffer nachgewaschen und ebenfalls in 0,05% NaN₃ bei 4°C gelagert. Verwendete Fraktionen: Kaninchen 1, H2 und H6.

Für die Depletion wurde KO-Nierengewebe eingesetzt. Je 5 SDS-Gele wurden mit je 100µg Protein/lane beladen (1mg Protein/Gel), elektrophoretisch aufgetrennt und geblottet. Zwei 1:100-Verdünnungen ausgewählter Elutionsfraktionen in Antikörperstammlösung wurden nacheinander mit den blockierten Membranen üN bei 4°C inkubiert und der Erfolg der Depletion im Anschluss im Western Blot mit WT-Nierengewebe überprüft.

B.2.2.8 Plasmamembranpräparation mittels differentieller Zentrifugation

Um den Membrangehalt von Aquaporin 2 im Gewebe bestimmen zu können, ist es nötig, mittels differentieller Zentrifugation die Plasmamembranen zunächst anzureichern und von sonstigen

Zellorganellen, allen voran endozytotischen Vesikeln, abzutrennen. Hierzu wurde ein publiziertes Protokoll leicht adaptiert [145]. 0,5h nach Water Load (WL) bzw. sham-Behandlung wurden die Mäuse anästhesiert und mit kaltem PBS retrograd perfundiert (siehe S.48). Die Nieren wurden entnommen und die medullären Fragmente makroskopisch herauspräpariert und sofort weiterverarbeitet. Nach der Homogenisierung in 0,5-1ml kaltem Dissektions-Puffer (siehe Tab. 5) im Ultra-Turrax wurde das Homogenat dreimal mit ansteigenden g-Zahlen jeweils bei 4°C zentrifugiert (4000g, 15min; 17000g, 30min (Plasma-Membran-Fraktion); 150000g, 1h10min (Vesikel-Fraktion). Die beiden Pellets wurden jeweils wieder in Dissektions-Puffer gelöst (PM-Pellet 50-80µl, Vesikel-Pellet: 30µl), die Proteinkonzentration am Qubit vermessen und anschließend je 70-100µg Proteinlysate mittels SDS-PAGE und Western Blot weiter charakterisiert (siehe S.39-41).

B.2.2.9 Immunhistochemie und Mikroskopie

Bei immunhistochemischen Färbungen werden Antigene in Gewebeschnitten detektiert. Das Prinzip ist vergleichbar mit dem des Immuno-Blots (siehe S.41), wenngleich die Gewebepreparation hier aufwendiger ist, da das jeweilige Organ zunächst perfundiert (siehe S.48), fixiert, dehydriert, für Paraffinschnitte in Paraffin eingebettet, geschnitten und auf Objektträger aufgezogen werden muss. Im Anschluss können die Gewebeschnitte dann entparaffiniert und mit Antikörpern behandelt werden. Im Gegensatz zum Western Blot, bei dem als Reportergruppe häufig eine Peroxidase an den Sekundärantikörper gekoppelt ist, wird bei der Immunhistochemie meist ein Fluoreszenzfarbstoff verwendet (Immunfluoreszenz). Dadurch sind gebundene Antikörper und damit indirekt das Protein nach Laseranregung unter dem Mikroskop nachweisbar. Neben einem klassischen Lichtmikroskop, welches hauptsächlich zur Aufnahme von Übersichtsbildern mittels AxioVision benutzt wurde, kam zur Detektion von Aquaporin 2 zusätzlich ein konfokales Laser-Scanning Mikroskop (CLSM) zum Einsatz. Hier rastert ein vom Objektiv fokussierter Laserstrahl das Präparat punktförmig ab, so dass nicht die gesamte Schichtdicke, sondern nur einzelne Ebenen des Schnittes beleuchtet werden. Gerade bei der Beurteilung von Veränderungen der Membranexpression von Proteinen bietet diese Mikroskopier-Technik im Vergleich zu konventionellen Laser-Mikroskopen einen deutlichen Vorteil.

Sämtliche Pufferzusammensetzungen, die im Rahmen der immunhistochemischen Färbungen genutzt wurden, finden sich in Tab. 5, S.31.

Zur immunhistochemischen Analyse von ENaC wurden die Tiere zunächst mit 15ml 0,9%NaCl + Heparin (10 I.E./ml), im Anschluss mit ca. 25ml Fixierlösung perfundiert. Hierbei wird die Proteinstruktur quervernetzt, wodurch autokatalytische Prozesse unterbunden werden und die Zellstruktur in einem möglichst nativen Zustand erhalten bleibt. Ein weiterer Vorteil besteht in der Versteifung des Gewebes, so dass es leichter schneidbar wird. Nach Entnahme und Entfernung der Nierenkapsel wurden die Nieren bis zur Dehydrierung in 70% Methanol bei 4°C aufbewahrt.

Zur immunhistochemischen Analyse von Aquaporin 2 wurde ein publiziertes Protokoll adaptiert [145]. Die Tiere wurden zunächst 30 Min nach Water Load (siehe S.47) mit kaltem PBS, anschließend mit Fixierlösung perfundiert (siehe S.48). Nach der Nierenentnahme wurden diese für weitere 2h in 8% Paraformaldehyd (PFA) in Fixierlösung post-fixiert. Die Nieren wurden anschließend für 30min mit 2,3M Sucrose/2% PFA infiltriert und schließlich bis zur weiteren Verwendung ebenfalls in 70% Methanol im Kühlschrank gelagert.

Dehydrierung und Paraffineinbettung

Nach der Fixierung wurden die Nieren in Einbettkassetten durch eine Methanolreihe zunehmender Konzentration (70%, 80%, 90%, 100%, je zweimal 30min, schwenkend bei RT) schrittweise dehydriert. Nachfolgend erfolgten drei Spülschritte mit 100% Isopropanol (je 30min), der dritte Spülschritt wurde bei 45°C im Wärmeschrank durchgeführt. Um die Diffusion von Paraffin in das Gewebe zu erleichtern, wurden die Kassetten im Anschluss 30min bei 60°C in ein vortemperiertes 1:1 Isopropanol/Paraffin-Gemisch gelegt. Zur völligen Durchtränkung des Gewebes verblieben die Organe sodann mind. 24h bei 60°C in reinem Paraffin. Schließlich wurden die Nieren in Einbettformen in flüssiges Paraffin eingebettet, welches mind. 24h bei 4°C ausgehärtet wurde.

Anfertigung von Paraffin-Schnitten

Die eingebetteten Organe wurden mit einem Rotationsmikrotom geschnitten, wobei die Schichtdicke 4µm betrug, anschließend in einem auf 40°C vortemperierten Wasserbad gestreckt und auf Objektträger aufgezogen. Zur Entparaffinierung und Rehydrierung wurden die Schnitte zweimal 10min in 100% Xylol, dreimal 5min in 100% Isopropanol und schließlich zweimal 5min in 100% Methanol getaucht.

Immunhistochemische Färbung

Nach der Entparaffinierung wurden die Schnitte zunächst kurz in H₂O_{dest} getaucht und anschließend zur Demaskierung 1h in Tris/EDTA gekocht. Dieser Schritt ermöglicht, dass die durch die Fixierung entstandenen Quervernetzungen der Proteine zum Teil wieder rückgängig gemacht werden und damit die Immunreaktivität der Proteine wiederhergestellt wird. Nachdem die Schnitte anschließend ca. 15min bei RT abgekühlt wurden, erfolgte zunächst ein Blockierungsschritt mit 3% H₂O₂ in Methanol (20min, RT) und anschließend zweimaliges Waschen für 5min mit PBS. Im zweiten Blockierschritt, der mit 10% Horse-Serum und 1% BSA in PBS für 2h bei RT unter leichtem Schütteln durchgeführt wurde, erfolgte eine Absättigung unspezifischer Bindungsstellen. Nachfolgend wurden die Schnitte üN bei 4°C mit dem jeweiligen Primär-Antikörper (verdünnt in 2,5% Horse-Serum/1% BSA in PBS, Verdünnungen siehe Tab. 4, S.30) im Feuchtkammerschüttler inkubiert. Überschüssiger Antikörper wurde am Folgetag durch drei Waschschrte (mit 1% BSA in PBS, je 5min) abgewaschen und die Schnitte für 2h unter Lichtausschluss im Feuchtkammerschüttler bei RT mit dem fluoreszenzgekoppelten

Sekundär-Antikörper (verdünnt in 1% BSA in PBS, Verdünnungen siehe Tab. 4, S.30) beladen. Letztlich wurden die Präparate nochmals dreimal für 10min bei RT mit PBS im Dunkeln gewaschen und schließlich mit Mounting Medium und einem Deckgläschen konserviert. Die mikroskopische Betrachtung erfolgte an den in Tab. 2 genannten Mikroskopen, die jeweiligen mikroskopischen Einstellungen sind jeweils in den Ergebnissen im Text erläutert.

B.2.3 Tierexperimente und physiologische Versuche

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendete cGKI-KO-Mauslinie wurde unter dem genetischen Hintergrund 129/Sv mittels nicht-konditionalem Gene-Targeting von Alexander Pfeifer generiert [174]. Zucht und Haltung erfolgten im zentralen Tierlaboratorium der Universität Regensburg unter standardisierten Bedingungen (konstante Umgebungstemperatur, 12h-Hell-Dunkel-Rhythmus, *ad libitum* Zugang zu Wasser und Futter). Für die Zucht wurden jeweils zwei heterozygote Weibchen mit einem heterozygoten Männchen (je im Alter von mind. 8 Wochen) verpaart, Nachkommen anhand von Pfoten- bzw. Schwanzbiopsien mittels PCR (siehe Anhang S. 124) genotypisiert und nach 3-4 Wochen geschlechtergetrennt von der Mutter abgesetzt. Experimentell eingesetzt wurden jeweils Tiere im Alter von 8-14 Wochen beider Geschlechter, wobei Wildtyp (WT)- und Knockout (KO)-Tiere idealerweise für die einzelnen Versuche aus derselben Verpaarung stammten (litter-matched controls).

Alle Experimente wurden gemäß den deutschen Tierschutzbestimmungen/FELASA (Federation of European Laboratory Animal Science Associations) durchgeführt und von der lokalen zuständigen Behörde genehmigt.

Bei Anästhesie-pflichtigen Versuchen wurden die Tiere durch Inhalationsanästhesie mit Isofluran (2,5% Isofluran in Sauerstoff, Flussgeschwindigkeit 60ml/min) betäubt. In Einzelfällen erfolgte die Anästhesie mittels Ketamin/Xylazin, hierbei wurde Ketamin 10% mit Xylazin 2% im Verhältnis 3:1 gemischt und 20-40µl pro Maus (abhängig vom Körpergewicht) i.p. injiziert.

B.2.3.1 Stoffwechsel-Versuche

Untersuchungen in sog. Stoffwechselkäfigen sind ein adäquates Mittel zur sauberen Probengewinnung von Urin, da hier eine getrennte Sammlung von Urin und Faeces möglich ist. Den Tieren wurde über einen Zeitraum von 3-5 Tagen eine Adaptierung an die Umgebung und an veränderte Futterbedingungen (Normal-, Hoch- und Niedrigsalz-Diäten) ermöglicht. Hierdurch wird das Risiko, dass Untersuchungsergebnisse durch Stress-Induzierung beeinflusst werden, möglichst minimiert. Im Anschluss an diese Eingewöhnungs-Phase wurde der Urin über 24h (Basalparameter, mit freiem Zugang zu Futter und Wasser) bzw. 18h (Durst-Versuche, ohne Zugang zu Futter und Wasser) gesammelt. Bei Volumenexpansions-Experimenten (= water load, WL) wurde den Mäusen nach einer zweistündigen initialen Wasser- und Futter-Deprivation mittels Schlundsondierung 3% vom Körpergewicht einer 10mM Glucose-Lösung verabreicht, sham-Kontrollen wurde die Schlundsonde eingeführt, jedoch keine Lösung injiziert. Im Anschluss wurde der Urin über 6h (in 2h Intervallen) gesammelt. Die Lagerung von Urin bis zur

weiterführenden Analyse erfolgte bei -80°C . Zusätzlich zu den basalen WL-Experimenten wurden Versuche durchgeführt, bei denen Mäusen das Diuretikum Amilorid appliziert wurde. Die Administration erfolgte oral, simultan mit der Schlundsodierung zur Volumenexpansion ($c = 6\text{mg/kg/d}$).

B.2.3.2 Serum-Gewinnung

Für die Untersuchung von Serum-Parametern wurden die Mäuse zunächst anästhesiert und mithilfe einer Heparin-beschichteten Kapillare aus dem retrobulbären Plexus Blut entnommen. Die Serumgewinnung erfolgte, indem das Blut zur Gerinnung zunächst 20 min auf Eis gelagert, und anschließend nach Zentrifugation (5 min, 4°C , 4000g) das Serum getrennt von den zellulären Bestandteilen des Blutes abpipettiert wurde. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Serumproben bei -80°C gelagert.

B.2.3.3 Retrograde Perfusion

Wurden Organe für weiterreichende Untersuchungen mittels proteinbiochemischer Methoden (siehe 2.2) benötigt, so wurde unter Anästhesie eine retrograde Perfusion (siehe Abb. 8) durchgeführt. Hierbei wurde den Tieren das Abdomen geöffnet und die Bauchaorta freipräpariert. Diese wurde unterhalb der Abgänge der Arteriae renalis abgeklemmt und distal zur Klemme angeschnitten, so dass anschließend der Perfusionskatheter eingeführt werden konnte. Nach Fixierung des Katheters mit einer zusätzlichen Klemme konnte die proximale Aortenklemme wieder entfernt und die Vena cava inferior als Abflussmöglichkeit für die Perfusionslösung geöffnet werden. Das Blut wurde zunächst mit ca. 15ml isotoner NaCl-Lösung bzw. PBS mit 10 I.E./ml Heparin gerinnungsfrei ausgespült, die Flussrate betrug 15ml/min. Im Anschluss erfolgte entweder direkt die Nierenentnahme und Entfernung der Kapsel (für Western Blot und cGMP-Bestimmung im Gewebe; Lagerung bei -80°C , siehe S.41 bzw. S.51) oder eine weitere Perfusion mit Fixierlösung und abschließender Nierenentnahme und Entfernung der Kapsel (für immunhistochemische Untersuchungen, Lagerung bei 4°C in 70% Methanol, siehe S.45).

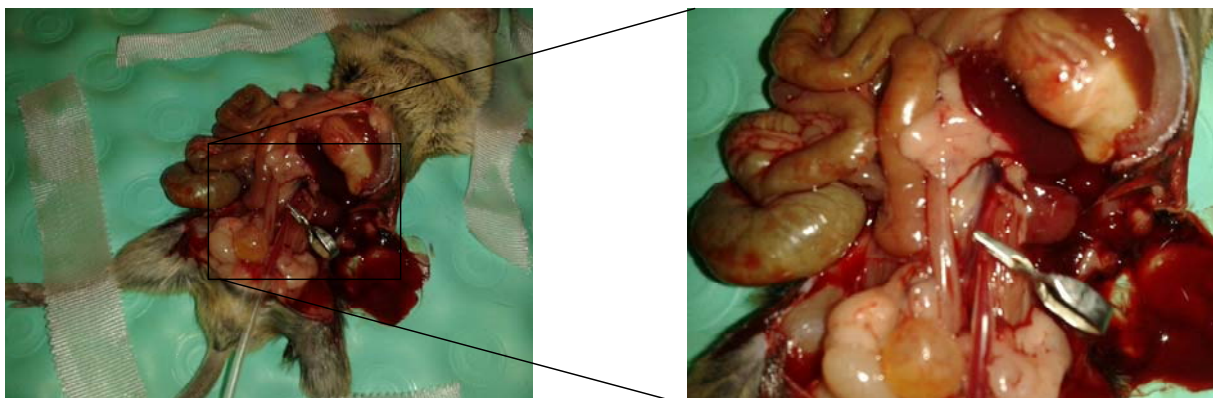


Abb. 8: Retrograde Perfusion

B.2.3.4 Blutdruckmessung

Aufgrund der geringen Größe gestaltet sich die Blutdruckmessung im Modellorganismus Maus technisch relativ aufwendig. Sie erfolgt entweder invasiv durch direkte Abnahme des Blutdrucks über die Arteria carotis/Arteria femoralis oder nicht-invasiv durch Messung des Blutdrucks an der Arteria caudalis (Tail-Cuff Plethysmographie). Während die invasive Messung häufig intraoperativ bzw. bei längerfristigen Blutdruckuntersuchungen mittels Telemetrie (hierbei wird den Mäusen ein Sender implantiert, der die erhaltenen Signale an eine Empfängerplatte weiterleitet) eingesetzt wird, kommt der nicht-invasiven Messung vor allem für kurzfristige Blutdruckanalysen eine wichtige Bedeutung zu.

Bei Tail-Cuff-Messungen wurden die Tiere in eine röhrenförmige Plexiglas-Vorrichtung gesetzt und der Schwanz durch eine Sensormanschetten-Einheit gefädelt. Die Signalaufnahme erfolgte photoelektrisch innerhalb einer auf 38°C temperierten Wärmekammer und wurde über einen Verstärker an die entsprechende Software weitergeleitet und aufgezeichnet. Die Mäuse wurden vor den eigentlichen Messungen zunächst für 5 Tage zweimal täglich in die Apparatur eingesetzt, um eine Adaption zu gewährleisten und Stress-induzierte Änderungen des Blutdrucks möglichst zu minimieren. Im Anschluss wurde jede Messung mind. dreimal wiederholt, damit ein sauberes Signal (ohne Schwanzausschläge) erhalten werden konnte. Die Auswertung erfolgte mithilfe der vom Hersteller zur Verfügung gestellten Software (Blood Pressure Data Acquisition Software).

B.2.3.5 Urin- und Serumanalyse

Die Analysen verschiedener Parameter in Urin und Serum erlauben es, eine erste Aussage über die Nierenfunktion in einem Organismus treffen zu können. Während die Bestimmung der Kreatininkonzentration in Urin und Serum einen Hinweis auf die Funktionalität der glomerulären Filtration liefert, können durch die Messung von Elektrolyten, Osmolarität und pH tubuläre Transportprozesse beurteilt werden.

B.2.3.5.1 Kreatininbestimmung mittels HPLC

Die HPLC-basierte Bestimmung der Kreatininkonzentration wurde freundlicherweise unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. Frieder Kees (Lehrstuhl für Pharmakologie und Toxikologie, Universität Regensburg) durchgeführt. Hierbei wurde eine bereits publizierte Methode [55] als Grundlage herangezogen und optimiert. Je 10µl Serum/Urin wurden zunächst mit 500µl Acetonitril versetzt und 15min bei 4°C inkubiert. Die hierdurch präzipitierten Proteine wurden abzentrifugiert (3min, 10000g) und 450µl des Überstands im Vakuum eingedampft. Anschließend wurde der Rückstand in 100µl (Serum) bzw. 500µl (Urin) mobiler Phase resuspendiert und 10-20µl-Aliquots in die HPLC injiziert. Kreatinin eluierte nach einer Retentionszeit von 3,4min bei einer Flussrate von 1,0ml/min (Säulentemperatur 35°C). Zur Kalibrierung dienten jeweils externe Kreatinin-Standards bekannter Konzentration. Mit Hilfe von verdünntem Human-Urin mit bekanntem, von einem unabhängigen Institut vermessenen Kreatinin-Gehalt konnte die Qualität der jeweiligen HPLC-Läufe zusätzlich kontrolliert werden. Die Auswertung der Chromatogramme

erfolgte über die Peakhöhen, wobei mittels des externen Standards letztlich auf die Konzentration rückgerechnet werden konnte. Die Berechnung der auf das Körpergewicht (KG) normierten Kreatinin-Clearance erfolgte anhand folgender Formel:

$$\text{Kreatinin-Clearance} \quad [\mu\text{l}/\text{min}/\text{g}(\text{KG})] = \frac{c(\text{Kreatinin})_{\text{Urin}} * V(\text{Urin}) [\mu\text{l}]}{c(\text{Kreatinin})_{\text{Serum}} * t [\text{min}] * \text{KG} [\text{g}]}$$

B.2.3.5.2 Bestimmung von Elektrolyten, Osmolalität und pH

Natrium- und Kaliumkonzentrationen wurden mittels Flammenphotometrie ermittelt. Bei dieser Methode wird die zu vermessende Probe vor der Flamme vernebelt, wodurch die Elektronen thermisch angeregt werden. Der Übergang zurück in den Grundzustand ist bei den verschiedenen Elementen durch eine charakteristische Emission bestimmter Wellenlänge (Natrium: 589nm, Kalium: 766nm) gekennzeichnet. Das emittierte Licht wird über optische Filter aufgetrennt und die Intensität mit Hilfe eines Photodetektors vermessen und in ein elektrisches Signal umgewandelt. Hierbei besteht eine direkte Proportionalität zwischen emittierter Lichtintensität und Konzentration des jeweiligen Ions in der Probe. Zunächst erfolgte eine Kalibrierung des Flammenphotometers mittels einer vom Hersteller mitgelieferten Standard-Lösung. Diese wurde anhand einer Verdünnungsreihe mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ auf 1,25ppm, 2,5ppm, 5ppm und 10ppm Natrium bzw. Kalium verdünnt und das Gerät damit geeicht. Die zu vermessenden Proben wurden nachfolgend jeweils durch Verdünnung mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ diesem linearen Bereich angepasst und anschließend in Doppelbestimmung vermessen. Jeweils nach 10 Proben wurde die Kalibrierung mit Hilfe der Standard-Verdünnungsreihe überprüft und ggf. nachjustiert. Schließlich wurden die erhaltenen Doppel-Werte gemittelt, der Verdünnungsfaktor einberechnet und die Einheit von ppm in mM umgerechnet (wobei näherungsweise eine 1mM Konzentration bei Natrium einem Massenanteil von 23ppm und bei Kalium 39ppm entspricht; $1\text{ppm} = 1 \times 10^{-6} \text{g/l}$).

Zur Bestimmung der Chloridkonzentration wurde ein voll-automatisierter Elektrolyt-Analyzer verwendet, der nach dem Prinzip der elektrischen Leitfähigkeit die Konzentration eines Stoffes in einer Probe durch Abgleich mit einer im Gerät verbauten Referenz-Elektrode ermittelt und anschließend in eine Konzentrationsangabe (mM) umrechnet. Die Kalibrierung erfolgte an diesem Gerät automatisch, so dass lediglich die zu vermessenden Proben im Verhältnis 1:3 mit einer vom Hersteller mitgelieferten Verdünnungslösung gemischt werden mussten und anschließend direkt vermessen werden konnten.

Die Osmolalität einer Probe kann durch Gefrierpunktsbestimmungen analysiert werden. Hierbei macht man sich zunutze, dass gelöste Stoffe in einer wässrigen Lösung den Gefrierpunkt dieser Lösung im Vergleich zu reinem Wasser herabsetzen. Diese Gefrierpunktserniedrigung ist direkt proportional zur Osmolalität der untersuchten Lösung. Zunächst wurde das Osmometer mit Hilfe einer mitgelieferten Standardlösung (300mosmol/kg) und $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ kalibriert, 50 μl der zu

untersuchenden Proben wurden entweder unverdünnt oder, bei stark konzentrierten Proben entsprechend mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ verdünnt, eingesetzt.

Der pH-Wert der Urinproben wurde mit einem handelsüblichen pH-Meter gemessen.

B.2.3.5.3 Bestimmung von cGMP, Vasopressin und Aldosteron

Zur Analyse von Hormonen und second messenger- Molekülen sind heute kommerziell erhältliche ELISA-Kits meist der Goldstandard (im Rahmen dieser Arbeit verwendete Kits s. Tab. 3, S.29). ELISA steht für „Enzyme linked Immunosorbent Assay“ und beruht auf einem immunologischen Prinzip, vergleichbar dem des Western Blots (s.S. 41). Hierbei wird der primäre Antikörper an den Boden einer Mikrotiterplatte gekoppelt, die vorbereiteten Proben zugegeben und im Anschluss mit dem Sekundär-Antikörper inkubiert. Dieser trägt ein Detektionsenzym, häufig HRP, wodurch im Vergleich mit einer Standardreihe durch die Intensität des Farbumschlags eine quantitative Aussage möglich wird. Häufig ist die Probenvorbereitung von entscheidender Bedeutung bei der qualitativen Beurteilung von ELISA-Auswertungen.

Für die Bestimmung des cGMP-Gehalts in Gewebe wurde jeweils pro Tier 1h nach WL eine mit Spüllösung vorperfundierte Niere entnommen, gewogen und in 5% Trichloressigsäure (TCA) im Ultra-Turrax aufgeschlossen und enteweißt. Nach Zentrifugation (1500g, 4°C, 10min) wurden die Überstände insgesamt dreimal mit der 5-fachen Menge H_2O -saturiertem Ether von TCA extrahiert und der restliche Ether möglichst schonend verdampft (auf Eis im 60°C-Wärmeschränk). Im Anschluss wurden 50µl dieser so vorbereiteten Proben im ELISA eingesetzt. Urin-Proben wurden mittels Blasenpunktion gewonnen und in unterschiedlichen Verdünnungen ohne Prä-Extraktion analysiert. Die Durchführung des ELISAS erfolgte analog Herstellerangaben. Schließlich wurden die erhaltenen Konzentrationen auf die Kreatinin-Konzentration (Urin) bzw. auf das Nierengewicht (Gewebe) normalisiert. Weiterhin wurde die Arg-Vasopressin (AVP)-Exkretion ebenfalls mittels ELISA analysiert. Die Proben wurden per Blasenpunktion (0.5h nach WL) gewonnen und je 100µl ohne Vorbereitung eingesetzt. Die Normalisierung erfolgte analog oben.

Die Bestimmung der Aldosteron-Konzentrationen im Serum von retrobulbär entnommenem Blut wurde freundlicherweise von Herrn Philipp Tauber durchgeführt und folgte den Herstellerangaben.

B.2.4 Statistische Auswertung

Die Ergebnisse dieser Arbeit wurden als Mittelwert mit dazugehöriger Standardabweichung (SEM) angegeben. Für die Berechnung statistischer Unterschiede zwischen zwei Gruppen wurde der ungepaarte Student-t-Test (two-tailed, Konfidenz-Intervall 95%) angewandt. Ein Unterschied wurde mit $p < 0,05$ als statistisch signifikant (in den Abbildungen als * gekennzeichnet), mit $p < 0,01$ als hochsignifikant (**) und mit $p < 0,001$ als höchstsignifikant (***) erachtet. Statistische Unterschiede zwischen mehreren Gruppen wurden mittels One-Way-ANOVA (einfaktorielle Varianzanalyse) mit nachfolgendem Bonferroni-post-Test ermittelt. Die Signifikanzlevel

entsprachen hierbei den oben genannten und wurden in den Abbildungen mit °, °° und °°° gekennzeichnet.

B.2.5 Verwendete Software

In dieser Arbeit wurden neben Windows-Programmen und Microsoft Office sowie spezieller Geräte-Software, sofern nicht anders angegeben, folgende Programme verwendet: GraphPadPrism (Erstellung von Graphen und Signifikanz-Analyse), DNAMAN (Sequenz-Analyse), AxioVision und Zen (Mikroskopie), ImageJ (Densitometrie). Biomedical PPT-Toolkit-Suite (Erstellung von Schemata, freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Johannes Hüttner).

vorrangig verwendete Datenbanken:

Literatur: PubMed des NCBI, US

Sequenzen: Gene- und Protein-Datenbank des NCBI, US sowie Ensembl des EMBL-EBI, UK

C. Ergebnisse

C.1 Herstellung eines spezifischen Antikörpers gegen cGKII

Wie bereits eingangs erwähnt, sind spezifische Antikörper ein unverzichtbares Mittel für die funktionelle Analyse von Proteinen in bestimmten Geweben. Bisher standen zur Analyse von cGKII in der Niere keine geeigneten spezifischen Antikörper zur Verfügung. Daher war ein wichtiges Ziel dieser Arbeit, einen cGKII-spezifischen Antikörper herzustellen. Im Vorfeld wurde versucht, das gesamte Protein in einem eukaryontischen System zu exprimieren (Sf9-Zellen). Nach der Expression gelang es jedoch nicht, trotz diverser Versuche mit unterschiedlichen Detergentien, das membranständige Protein zu lösen bzw. wieder zu renaturieren. Auch die Verwendung einer mutierten cGKII-Form, bei der ein Glycin zu Alanin ausgetauscht und damit die Myristoylierungsstelle zerstört wurde, so dass das Enzym nicht mehr an der Membran verankert werden konnte, brachte nicht den gewünschten Erfolg. Zwar konnte das Protein anschließend solubilisiert werden, allerdings nur unter Verwendung starker Denaturierungsmittel wie z.B. 8M Harnstoff. Die Änderung der Proteinstruktur verhinderte nachfolgend die Aufreinigung mittels affinitätschromatographischer Methoden, da hierdurch anscheinend das Protein nicht mehr an die Säulenmatrix gebunden werden konnte (Daten nicht gezeigt). Aus diesem Grund wurde im Rahmen dieser Arbeit die N-terminale Domäne der cGKII in einem prokaryontischen System exprimiert und aufgereinigt. Hierbei wurde dieser Teil des Proteins gewählt, da N-terminal die meisten strukturellen Unterschiede zwischen den verschiedenen cG-Kinase-Isoformen auftreten. Anschließend wurden mit diesem Protein Kaninchen immunisiert. Das aus diesen Kaninchen isolierte Antikörper-angereicherte Serum wurde schließlich affinitätschromatographisch aufgereinigt und der erhaltene Antikörper im Western Blot auf Spezifität getestet.

C.1.1 Klonierung der N-terminalen Domäne der cGKII

Zunächst wurde unter Verwendung spezifischer Primer die Basensequenz, die für den zur Immunisierung ausgewählten N-terminalen cGKII-Teilabschnitt (Aminosäure 4-183) codiert, mittels PCR angereichert. Als Template diente hierbei die cDNA-Sequenz der cGKII, die bereits einkloniert in pVL1393 vorlag. Nachdem mittels einer Gradienten-PCR die optimale Annealing-Temperatur der Primer ermittelt wurde (58,4°C), wurde unter diesen Bedingungen eine PCR durchgeführt, die PCR-Probe anschließend auf ein Agarosegel aufgetragen und die DNA-Bande, die mit der richtigen berechneten Größe (540bp) übereinstimmte, mithilfe eines Gel-Extraktionskits extrahiert. Nachdem ein Kontroll-Verdau mit Restriktionsenzymen die Amplifikation des korrekten DNA-Abschnitts bestätigt hatte, wurden anschließend in zwei präparativen Restriktions-Verdau-Ansätzen diese DNA sowie der pRSETB-Vektor mit HindIII und BglII geschnitten. Dem Vektor-Ansatz wurde nach einer Stunde Verdauzeit zusätzlich eine Phosphatase (SAP) zugefügt, um eine Recircularisierung des Vektors zu verhindern. Die präparativen Ansätze wurden schließlich wiederum im Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt,

aus dem Gel extrahiert und Insert und Vektor in einer Ligations-Reaktion zusammengefügt. Nach der Transformation in kompetente E.coli (Stamm BL21(DE3)pLysS), bei der eine zufriedenstellende Transformationseffizienz erreicht werden konnte (ca. 100 Klone bei 50µl ausplattiertem Volumen), wurden 5 Klone gepickt und mittels Miniprep die Vektoren aufgereinigt. In Abb. 9 ist beispielhaft ein Agarosegel mit Proben verschiedener Restriktionsverdau-Ansätze von Klon 1 gezeigt. Als Kontrolle (K) wurde der ligierte Vektor nach Einklonierung und anschließender Miniprep in E.coli Top10 verwendet. Der Verdau mit nur einem der beiden für die Ligation verwendeten Restriktionsenzyme (BglII) führt zu einer Linearisierung des Vektors, so dass im Gel eine Bande bei 3,5kb erscheint. Wird der Vektor mit beiden Restriktionsenzymen (BglII/HindIII) geschnitten, so kommt es zu einer Excision des Inserts, im Gel treten zwei Banden (linearisierter Leer-Vektor mit 2,9kb und Insert mit 0,54kb) auf. Zur Überprüfung, ob das Insert in der richtigen Orientierung im Vektor vorlag, wurde zusätzlich ein Kontroll-Verdau mit BamHI durchgeführt. Bei richtiger Orientierung schneidet BamHI den ligierten Vektor 5' kurz vor Beginn der Insert-Sequenz sowie downstream kurz vor dem Stopp-Codon. Hierbei können im Gel zwei Banden von 2,9kb (Vektor-Fragment) sowie 0,52kb (Insert-Fragment) nachgewiesen werden. Eine weitere Bande bei 4,9kb weist auf das pLysS-Plasmid hin, welches im verwendeten Expressionsstamm bereits vorhanden ist.

Zusätzlich zu den beschriebenen Restriktionsverdaus wurde die Insert-Sequenz des ligierten Vektors von der Firma Entelechon GmbH sequenziert. Die Sequenzierung verifizierte die Ligation in korrekter Orientierung sowie eine mutationsfreie Sequenz.

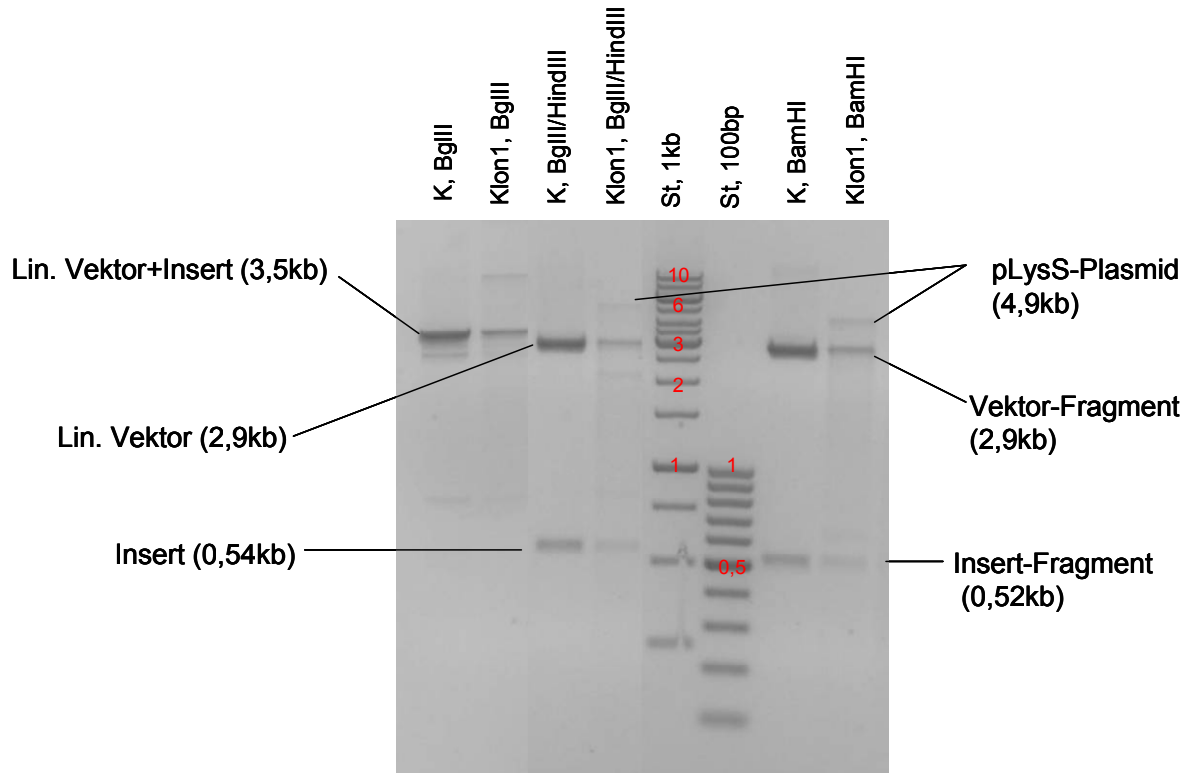


Abb. 9: Qualitativer Restriktionsverdau zur Überprüfung der erfolgreichen Transformation sowie der korrekten Orientierung

K: Kontrollplasmid aus E.coli Top10, Klon1 : pRSET_N-Term-transformierter Klon aus E.coli BL21(DE3)pLysS; BglII: Vektorlinearisierung, BglII/HindIII: für Einklonierungen verwendete Res, BamHI: Überprüfung der Orientierung. Weitere Erklärungen siehe Text.

C.1.2 Expression in E.coli BL21(DE3)pLysS

Um möglichst hohe Proteinausbeuten zu erhalten, wurden verschiedene Versuchsparameter optimiert, unter anderem verwendeter Klon, IPTG-Konzentration und Induktionszeitpunkt, Inkubationstemperatur und Inkubationsdauer. Für den letztgenannten Parameter ist in Abb. 10 beispielhaft ein Coomassie-gefärbtes Gel sowie der zugehörige, mit anti-His6-inkubierte Western Blot gezeigt. Hierzu wurde ein 30ml Ansatz LB-Medium mit Antibiotikazusätzen aus einer Übernachtskultur überimpft, bei 37°C unter leichtem Schütteln inkubiert, bis eine OD₆₀₀ von 0,5 erreicht war, und die Expression mit 1mM IPTG induziert. Nach 0h, 6h, 18h und 24h wurde jeweils eine 1ml-Probe entnommen und die Bakterien per Zentrifugation pelletiert. Nach dem Zellaufschluss wurde die Proteinkonzentration vermessen und je 10µg Protein auf zwei Tricin-Gelen elektrophoretisch aufgetrennt. Während nach 6h Inkubationszeit im Coomassie-Gel und im Western Blot (inkubiert mit His6-Antikörpern) eine deutliche Zunahme der Bandenstärke (25kDa-Bande) zu erkennen ist, führt eine 8 bzw. 12-stündige Expression nicht zu einer weiteren Steigerung der Proteinmenge (nicht gezeigt). Bei längeren Inkubationszeiten ist die Bandenstärke deutlich rückläufig (vgl. Abb. 10). Es ist anzunehmen, dass sich die Bakterien bei längeren Expressionszeiten bereits in der Absterbephase befanden, so dass proteolytische Vorgänge zu einer Verminderung der Proteinmenge geführt haben. Somit wurde eine 6-stündige

Inkubation als optimal angesehen, das finale Expressions-Protokoll, in welchem sämtliche weiteren Optimierungen enthalten sind, findet sich auf S.37.

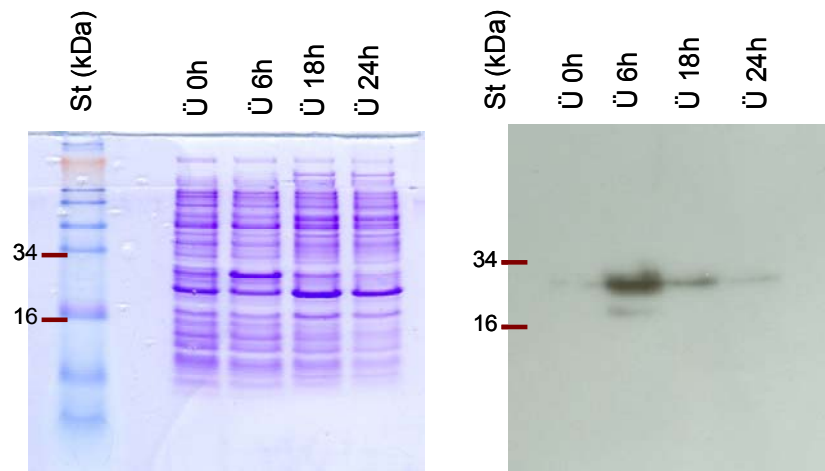


Abb. 10: Analyse der cGKII-N-Terminus-Expression mit unterschiedlichen Expressionszeiten

Links: Tricin-Gel-Analyse mit je 10µg Gesamtprotein im Überstand (Ü); rechts: zugehöriger Western Blot mit anti-His6-Detektion. Weitere Erklärungen siehe Text.

C.1.3 Protein-Aufreinigung mittels Ni-NTA- Affinitätschromatographie

Nach der Expression des N-terminalen Bereichs der cGKII wurde im Anschluss dieses Protein mittels Ni-NTA-Affinitätschromatographie aufgereinigt. Auch für diesen Reinigungsschritt wurde zunächst das Protokoll optimiert, um letztlich ein möglichst sauberes Protein in ausreichender Ausbeute zu erhalten (nicht gezeigt). Es stellte sich heraus, dass ein schrittweise ansteigender Gradient der Imidazol-Konzentration im Waschpuffer zwar zu einem gewissen Verlust, aber dafür auch zu einer zufriedenstellenden Reinheit des gewünschten Proteins führte (finale Protokoll vgl. S.38). In Abb. 11 ist exemplarisch die Analyse der Aufreinigung eines 500ml-Expressionsansatzes gezeigt. Hierbei wurden von den verschiedenen Fraktionen je 10µl, von den Expressionskontrollen (Ko 0h, Ko 6h) je 10µg Protein auf Tricin-Gele aufgetragen und mittels Coomassie-Färbung bzw. im Western Blot mit anti-His6-Antikörpern die erhaltenen Proteine detektiert. Auffallend ist, dass in den Eluatfraktionen nicht eine distinkte Bande auftritt, sondern unterhalb der erwarteten Bande weitere Banden mit einem geringeren Molekulargewicht registriert werden konnten. Aus diesem Grund wurden die Western Blot-Membranen zusätzlich mit Anti-Xpress (ein Antikörper, der gegen ein Epitop gerichtet ist, welches auf dem Expressionsvektor codiert vorliegt und zusammen mit dem einklonierten Protein exprimiert wird) und einem kommerziell erhältlichen cGKII-Antikörper (welcher zumindest bei aufgereinigten Proteinen spezifische Signale ergibt) inkubiert (nicht gezeigt). Da sich hier ein ähnliches Bild zeigte wie beim anti-His6-inkubierten Western Blot, und die gleichen Banden detektiert werden konnten, ist davon auszugehen, dass es im Laufe der Aufreinigung trotz Verwendung von Protease-Inhibitoren in sämtlichen Puffern zu einer gewissen Proteindegradation gekommen ist und es sich bei den erhaltenen Banden wohl um verschiedene Abbauprodukte des cGKII-N-

C. Ergebnisse

Terminus handelt. Paradoxerweise konnte bereits vor IPTG-Induktion eine starke basale Expression beobachtet werden (Abb. 11). Das T7-Lysozym, welches auf dem im verwendeten Bakterienstamm vorliegenden pLys-Plasmid codiert vorliegt, sollte diese basale Expression für gewöhnlich verhindern. Weshalb diese dennoch stattfand, konnte nicht zweifelsfrei geklärt werden. Eine Mutation in der Promotorsequenz des pRSET-Vektors konnte ausgeschlossen werden, da dessen Sequenz mittels Sequenzierung überprüft wurde. Möglicherweise führten Mutationen im pLys-Plasmid dazu, dass das exprimierte Lysozym nicht funktionell war. Es wurden verschiedene Versuche unternommen, die basale Expression zu unterbinden, u.a. wurden verschiedene Klone ausgetestet (nicht gezeigt). Diese brachten jedoch nicht den gewünschten Erfolg, so dass die basale Expression letztlich in Kauf genommen wurde.

Schließlich wurden die Zelllysate von vier 500ml-Expressionsansätzen mit der Ni^{2+} -NTA-Matrix inkubiert, um die His-getaggten Proteine zu binden, die Säule im Anschluss mit einem Puffer mit ansteigender Imidazol-Konzentration gewaschen und die gebundenen Proteine mit 150mM Imidazol eluiert (vgl. S.38). Die erhaltenen Eluate wurden abschließend aufkonzentriert und 2mg Protein zur Immunisierung von Kaninchen an die Firma Davids Biotechnologie GmbH geschickt.

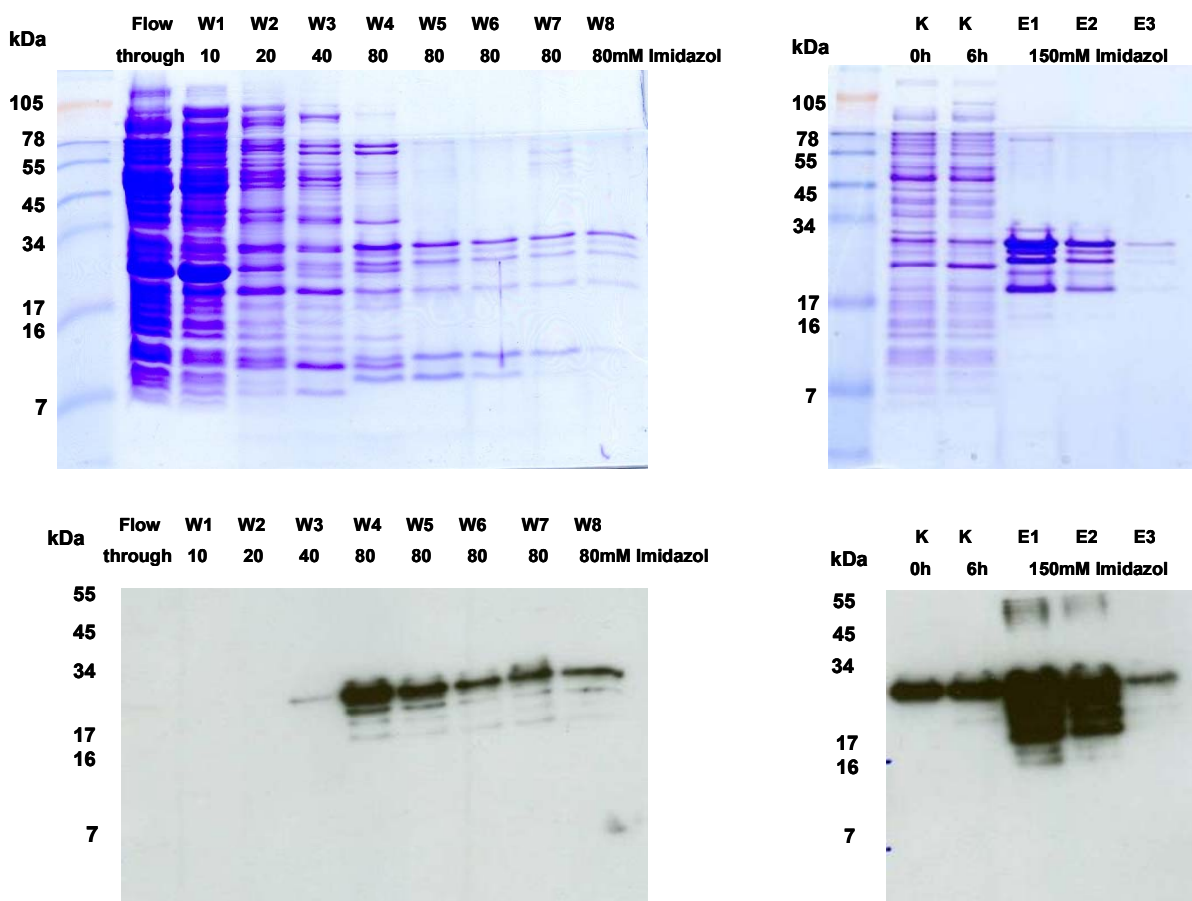


Abb. 11: Analyse der Aufreinigung des cGKII-N-Terminus durch Ni-NTA-Chromatographie

Oben: Tricin-Gel-Analyse mit auf 10µg Gesamtprotein normalisierten Kontrollen (0h bzw. 6h) bzw. 10µl Fraktions-Überständen, Unten: zugehöriger Western Blot mit anti-His6-Detektion. K=Expressions-Kontrollen, W=Waschfraktionen; E=Elutionsfraktionen. Weitere Erklärungen siehe Text.

C.1.4 Analyse der Finalseren

Im Rahmen der Immunisierung wurde das Protein drei Kaninchen insgesamt fünfmal im Abstand von jeweils zwei Wochen injiziert. Nachfolgend wurden die Finalseren gewonnen, der Antikörpertiter bestimmt (Kaninchen 1: 1:300000, Kaninchen 2: 1:80000, Kaninchen 3: 1:15000; durchgeführt von Davids Biotechnologie) und im Western Blot analysiert. Mittels Tricin-SDS-PAGE wurde zunächst das verwendete Antigen aufgetrennt und überprüft, ob die im Serum enthaltenen Antikörper dieses erkennen (vgl. Abb. 12, links). Nachfolgend wurde untersucht, ob mit diesen Seren cGKII-Protein in murinem Gewebe bzw. aufgereinigtes Enzym identifiziert wird. Es konnte jedoch kein spezifisches Signal in WT-Proben im Vergleich zu KO-Proben detektiert werden, sondern lediglich ein breites Spektrum unspezifischer Banden (nicht gezeigt). Aus diesem Grund wurde zunächst eine cGMP-Agarosefällung mit Proben von beiden Genotypen durchgeführt, um die Konzentration des zu detektierenden Proteins zu erhöhen. In Abb. 12 (rechts) ist eine cGMP-Agarosefällung mit jejunalem sowie renalem Gewebe aus WT und KO gezeigt, die mit dem Anti-Serum von Rabbit 1 inkubiert wurde (die beiden anderen Seren lieferten vergleichbare Ergebnisse und sind deshalb nicht dargestellt). Zusätzlich wurde 1,5ng aufgereinigte cGKII, sowie 1,5ng cGKI α aufgetragen. Beim erwarteten Molekulargewicht (83kDa) war sowohl beim reinen Protein als auch in der Spur, die mit der Fällung aus WT Jejunum beladen wurde, ein deutliches Signal zu erkennen. Im Gegensatz dazu war weder bei der cGKI α -Spur noch in einem KO-Gewebe eine Bande zu sehen. Nach Stripping der Membran und Nachinkubation mit anti-cGKI α konnte in sämtlichen Spuren mit Ausnahme der cGKII-Spur ein Signal erhalten werden, so dass eine Cross-Reaktivität des produzierten cGKII-Antikörpers mit cGKI ausgeschlossen werden konnte (Daten nicht gezeigt). Im Jejunum, welches wie einleitend beschrieben eine starke cGKII-Proteinexpression aufweist, reicht folglich die in unaufgereinigtem Serum enthaltene Antikörperkonzentration aus, um zumindest bei cGMP-Agarose-gefällten Proben ein spezifisches Signal zu erzeugen. Im Gegensatz dazu konnte mit Nierengewebe kein solches Signal nachgewiesen werden. Aus diesem Grund wurde im nächsten Schritt Serum von Rabbit 1 und 2 affinitätschromatographisch weiter aufgereinigt.

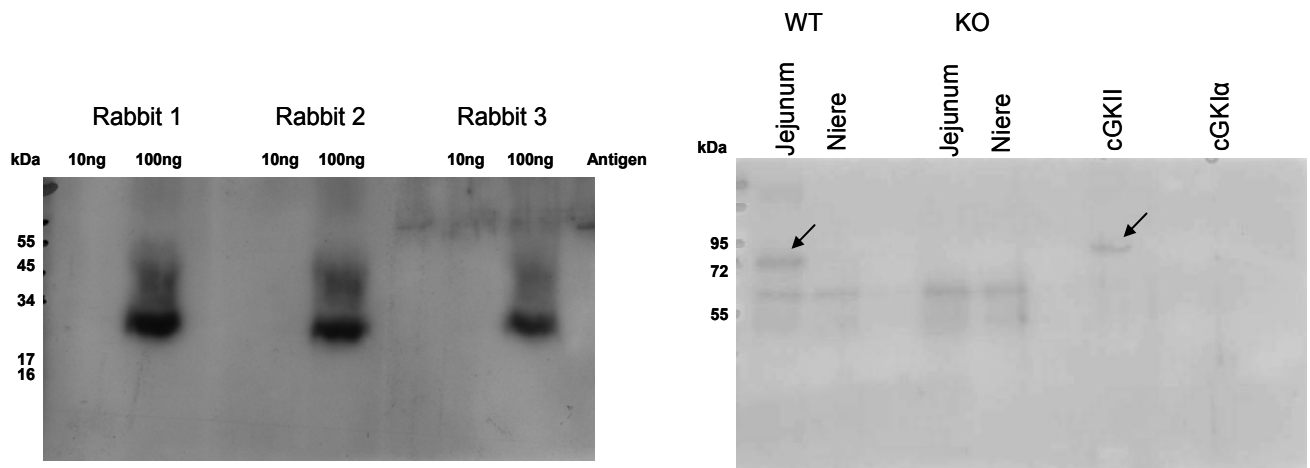


Abb. 12 Überprüfung der Antigen-Erkennung sowie der Erkennung von cGKII im Gewebe nach cGMP-Agarosefällung

Links: Tricin-Gel-Analyse/WesternBlot mit je 10 bzw. 100µg Antigen, Detektion mit 1:100 Verdünnungen der Seren. Rechts: cGMP-Agarose-Fällungen aus WT bzw. KO-Gewebe (je 1mg), Kontrollen: aufgereinigte cGKII bzw. cGKIa (je 1,5ng), analysiert mit 1:100 Verdünnung von Serum 1. Weitere Erklärungen siehe Text.

C.1.5 Antikörper-Aufreinigung und anschließende Depletion

Zur Anreicherung von cGKII-spezifischen Antikörpern wurde das Serum mithilfe einer CNBr-aktivierten und Antigen-gekoppelten Chromatographie-Säule aufgereinigt. Nach Bestimmung der Proteinkonzentration wurden die am höchsten konzentrierten Elutions-Fraktionen dialysiert und nachfolgend mit WT- und KO-Nierengewebe im Western Blot analysiert. Hierbei zeigte sich erstmals eine spezifische Bande auf der erwarteten Höhe, jedoch wurden nach wie vor einige unspezifische Signale detektiert. Aus diesem Grund wurde der Antikörper anschließend mit insgesamt 5mg KO-Nieren-Gewebe depletiert und erneut im Western Blot analysiert. Wie Abb. 13 veranschaulicht, konnten die zuvor aufgetretenen Nebenbanden durch die Depletion deutlich vermindert und in ihrer Intensität abgeschwächt werden. Auffällig ist, dass das im jejunalen WT-Homogenat erhaltene cGKII-Signal im Vergleich zum renalen Gewebe um ein Vielfaches stärker ausgeprägt ist. Demzufolge ist das Enzym im Jejunum wesentlich stärker exprimiert als in der Niere. Nicht außer Acht lassen darf man bei dieser Schlussfolgerung allerdings, dass es sich beim Jejunum um ein relativ homogenes Gewebe handelt, während die Niere, wie eingangs beschrieben, sehr heterogen aus vielen verschiedenen Abschnitten und damit unterschiedlichen Zelltypen besteht. Bei der Analyse einzelner Nephron-Segmente wie z.B. isolierten Sammelrohren könnte sich die Signalstärke deutlich unterscheiden.

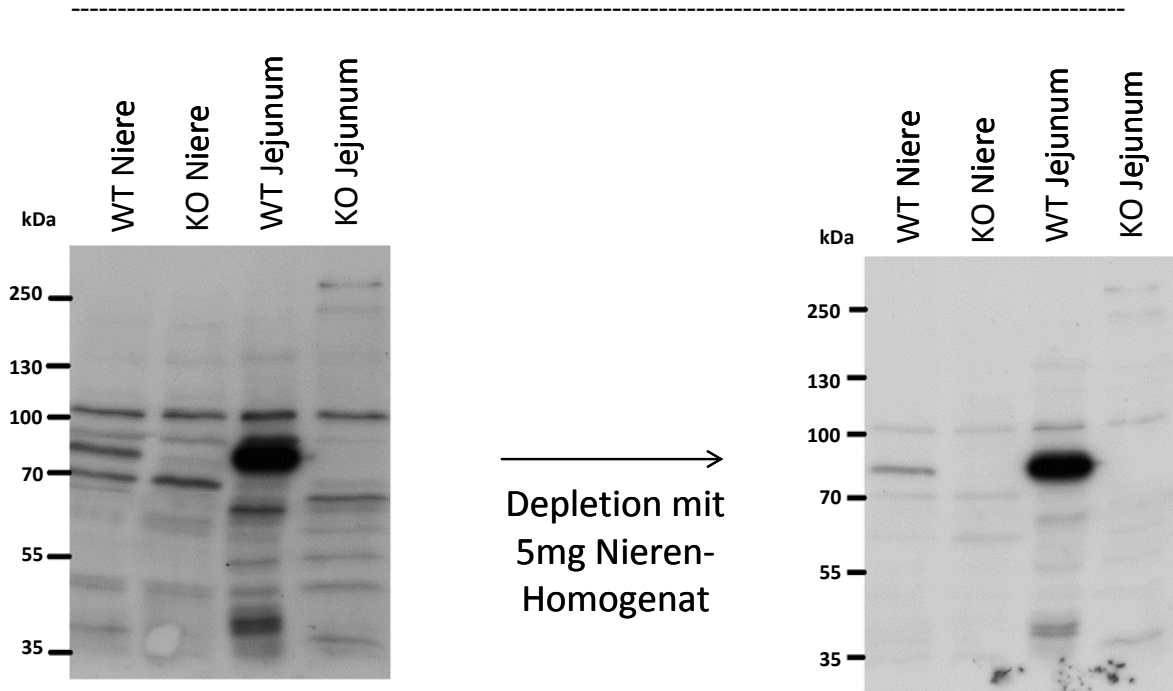


Abb. 13: Depletion des cGKII-Antikörpers

Links: SDS-Gel-Analyse/Western Blot mit je 70µg Gesamtprotein im Gewebeüberstand vor Depletion, Rechts: SDS-Gel-Analyse/Western Blot nach Depletion, Gelauftrag analog. Verwendeter Antikörper: cGKII-H2, 1:100 (aus Serum 1, Hauptfraktion 2). Weitere Erklärungen siehe Text.

C.2 Analyse basaler renaler Funktionen der cGKII

Neben der Produktion eines spezifischen cGKII-Antikörpers war das weitere Ziel dieser Arbeit, renale physiologische Funktionen der cGKII aufzuklären. Hierzu wurden zunächst basale Parameter sowie die Adaption von cGKII-Mäusen an salzarme sowie salzreiche Diäten untersucht.

C.2.1 Expression von cGKII in Cortex und Medulla

Als Erstes wurde mithilfe des generierten Antikörpers überprüft, ob die cGKII sowohl cortical als auch medullär exprimiert wird, um mögliche Funktionen eingrenzen zu können. Zu diesem Zweck wurde eine Mausniere makroskopisch in Cortex, innere und äußere Medulla unterteilt, die Gewebsfragmente aufgeschlossen und die gelösten Proteine per SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennt. Abb. 14 zeigt die Expression der cGKII in allen drei untersuchten Nierensegmenten, wobei Aquaporin 2 als Marker für die saubere Abtrennung diente (dessen Expression steigt von Cortex zu Papille stark an). Während eine annähernd gleich starke Expression in corticalem und inner-medullärem Gewebe beobachtet werden konnte, zeigte sich in der äußeren Medulla eine deutlich schwächere Expression. Einleitend wurde bereits beschrieben, dass im renalen Cortex die meisten Abschnitte der Nephronen lokalisiert sind. Der corticale Nachweis von cGKII erlaubt deshalb in diesem Bereich kaum eine funktionelle Eingrenzung. Im Gegensatz dazu befinden sich in der inneren Medulla/Papille an funktionellen Segmenten neben versorgenden Gefäßen

und einem Teil der Henle-Schleifen fast ausschließlich Sammelrohre bzw. Ductus papillaris-Fragmente. Die starke Expression der cGKII in diesem Nierenabschnitt deutet bereits auf eine mögliche Rolle der cGKII bei der abschließenden Harnaufkonzentrierung im Sammelrohr hin. Um die Harnaufkonzentrierung zu untersuchen, wurden als Nächstes *in vivo* Stoffwechsel-Versuche in Metabolismus-Käfigen durchgeführt.

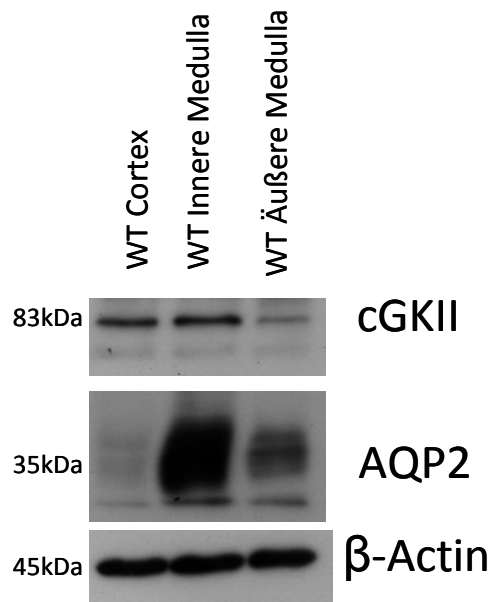


Abb. 14: cGKII-Expression in Cortex und Medulla

SDS-Gel-Analyse/Western Blot mit je 70µg Gesamtprotein im Gewebeüberstand. Verwendete Antikörper: cGKII-H2, AQP2 (Kontrolle der Gewebeabtrennung), β-Actin (Ladungskontrolle). Weitere Erklärungen siehe Text.

C.2.2 Basale Stoffwechsel-Daten

Diäten mit unterschiedlichen Salzkonzentrationen sind eine nützliche Methode, um die Harnaufkonzentrierung in Mäusen zu untersuchen. Aus diesem Grund wurde der Urin von je 10-12 WT und cGKII-KO-Tieren gemischten Geschlechts nach einer gewissen Adaptionszeit an Käfige und Futter für 24h gesammelt und nachfolgend verschiedene Parameter wie z.B. Urin-Volumen, ausgeschiedene Elektrolytkonzentrationen und Kreatinin-Clearance bestimmt. Tab. 8 (S.63) gibt eine Zusammenfassung der evaluierten Parameter wieder. Mit Ausnahme von Gewicht und Kreatinin-Spiegel im Urin unter Normalsalz-Bedingungen konnten bei den untersuchten Bedingungen keine signifikanten Unterschiede detektiert werden. Das geringere Körpergewicht wurde bereits von Pfeifer et al. beschrieben [174], entgegen der Publikation konnte im Rahmen dieser Arbeit ein signifikant vermindertes Nierengewicht festgestellt werden (vgl. Abb. 15, jeweils Gewicht beider Nieren). Die signifikante Verminderung des Nierengewichts korreliert gut mit dem verringerten Körpergewicht der cGKII-KO-Mäuse, so dass sämtliche Parameter auf das Körpergewicht bezogen werden konnten. Dies hatte den Vorteil, dass die

Mäuse nach Abschluss eines Versuchs mit der jeweiligen Diät nicht getötet werden mussten, um die Nieren zu entnehmen, sondern für weitere Untersuchungen zur Verfügung standen. Meist wird die Kreatinin-Clearance gleichgesetzt mit der glomerulären Filtrationsrate (GFR); bei dieser Herangehensweise wird die GFR jedoch häufig überschätzt. Kreatinin kann unter bestimmten Bedingungen tubulär sezerniert werden [249] und erfüllt somit nicht die idealen Voraussetzungen für eine Substanz zur Bestimmung der GFR. Aus diesem Grund wird in dieser Arbeit durchweg die korrekte Bezeichnung Kreatinin-Clearance statt GFR verwendet.

Zusätzlich zu den Natrium- und Kaliumkonzentrationen im Urin wurden diese unter Normal-Salz-Bedingungen auch im Serum bestimmt. Die Natriumkonzentrationen betrugen im WT $165,4 \pm 6,28$ mM (N=16), im KO $171,2 \pm 5,00$ mM (N=21), die Kaliumkonzentrationen im WT $6,03 \pm 0,20$ mM (N=16), beim KO $5,47 \pm 0,19$ mM (N=21). Um ein vollständiges Bild zu erhalten, wurde letztlich noch die Osmolalität im Serum unter Normalsalz-Bedingungen vermessen. Diese betrug im WT $300,8 \pm 1,82$ mosmol/kg (N=10), im KO $294,8 \pm 2,69$ mosmol/kg (N=13).

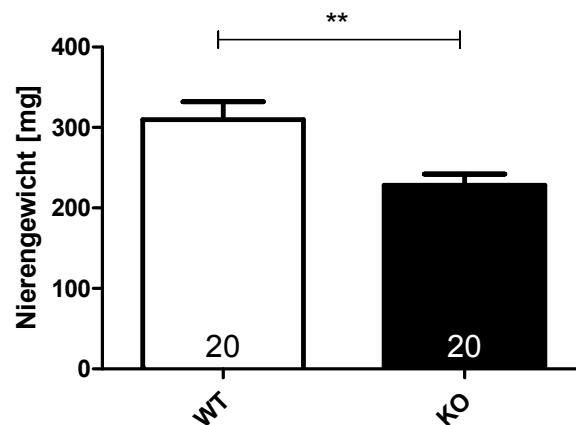


Abb. 15: Nierengewicht von WT- und cGKI-KO-Mäusen

Zur Analyse wurden jeweils beide Nieren nach der Organentnahme zusammen gewogen. **: hoch signifikant im t-Test ($p < 0,01$). Weitere Erklärungen siehe Text.

	Normalsalz (0,24% Na ⁺)	
	WT	KO
Gewicht [g]	23,3 ± 1,0	19,0 ± 0,7**
Wasseraufnahme [μl/g(BW)/24h]	230,1 ± 14,5	246,8 ± 20,8
Futtermittelaufnahme [mg/g(BW)/24h]	207,2 ± 8,9	211,0 ± 20,0
Urin-Volumen [μl/g(BW)/24h]	57,0 ± 8,3	37,9 ± 5,4
Urin [Na ⁺] [mM]	122,0 ± 12,0	153,9 ± 21,3
Urin [K ⁺] [mM]	524,9 ± 41,0	642,9 ± 50,2
UNa ⁺ V [μmol/g(BW)/24h]	6,4 ± 0,8	5,6 ± 1,0
UK ⁺ V [μmol/g(BW)/24h]	26,9 ± 1,6	23,0 ± 2,7
Serum Kreatinin [μg/ml]	0,54 ± 0,03	0,51 ± 0,03
Urin Kreatinin [μg/g(BW)/24h]	10,8 ± 0,7	7,8 ± 0,9*
Kreatinin Clearance [μl/g(BW)/min]	13,9 ± 0,9	10,9 ± 1,2

	Niedrigsalz (0,03% Na ⁺)	
	WT	KO
Gewicht [g]	22,5 ± 1,0	18,9 ± 0,9*
Wasseraufnahme [μl/g(BW)/24h]	167,2 ± 12,0	175,8 ± 20,0
Futtermittelaufnahme [mg/g(BW)/24h]	161,9 ± 8,3	151,4 ± 8,8
Urin-Volumen [μl/g(BW)/24h]	53,9 ± 4,2	48,4 ± 5,6
Urin [Na ⁺] [mM]	12,4 ± 3,1	7,0 ± 1,7
Urin [K ⁺] [mM]	454,7 ± 25,5	466,6 ± 38,3
UNa ⁺ V [μmol/g(BW)/24h]	0,7 ± 0,2	0,3 ± 0,1
UK ⁺ V [μmol/g(BW)/24h]	23,7 ± 1,2	21,3 ± 1,8
Serum Kreatinin [μg/ml]	0,50 ± 0,02	0,50 ± 0,02
Urin Kreatinin [μg/g(BW)/24h]	12,0 ± 0,9	10,7 ± 0,9
Kreatinin Clearance [μl/g(BW)/min]	16,8 ± 1,2	15,2 ± 1,5

	Hochsalz (4,00% Na ⁺)	
	WT	KO
Gewicht [g]	22,1 ± 0,8	18,7 ± 0,8**
Wasseraufnahme [μl/g(BW)/24h]	918,0 ± 43,7	929,6 ± 35,4
Futtermittelaufnahme [mg/g(BW)/24h]	214,1 ± 12,4	193,3 ± 7,9
Urin-Volumen [μl/g(BW)/24h]	918,0 ± 43,7	929,6 ± 35,4
Urin [Na ⁺] [mM]	369,5 ± 18,4	388,1 ± 14,4
Urin [K ⁺] [mM]	60,5 ± 3,2	62,5 ± 2,4
UNa ⁺ V [μmol/g(BW)/24h]	213,9 ± 15,4	216,5 ± 15,0
UK ⁺ V [μmol/g(BW)/24h]	34,8 ± 1,3	34,7 ± 2,4
Serum Kreatinin [μg/ml]	0,50 ± 0,03	0,50 ± 0,03
Urin Kreatinin [μg/g(BW)/24h]	15,8 ± 0,6	14,7 ± 0,8
Kreatinin Clearance [μl/g(BW)/min]	22,8 ± 1,5	21,4 ± 1,8

Tab. 8: Basale metabolische Parameter unter verschiedenen Salz-Diäten

Angabe gemittelter Werte ± SEM, n=10-12/Gruppe, BW: Körpergewicht), UNa⁺V: Na-Exkretion, UK⁺V: Kalium-Exkretion. Statistisch signifikante Unterschiede sind mit * (t-Test, p<0,05) bzw. ** (t-Test, p<0,01) markiert.

Weitere Erklärungen siehe Text.

C.3 Analyse der renalen Funktion der cGKII unter forcierten physiologischen Bedingungen

Nachdem im Vorfeld basale renale Parameter evaluiert wurden, sollte im Folgenden die Harnkonzentrierungs-Kapazität von cGKII-KO-Mäusen unter forcierten physiologischen Bedingungen untersucht werden. Hierzu wurden zwei konträre Versuchs-Bedingungen gewählt, zum einen sog. Durstversuche, bei denen die Urin-Aufkonzentrierung obligat ist, zum anderen sog. Volumenexpansionsversuche, bei denen eine Urin-Verdünnung nötig ist, um eine normale Serum-Osmolarität zu gewährleisten.

C.3.1 Durstversuche

Durstversuche ermöglichen die Überprüfung renaler Aufkonzentrierungsmechanismen bei Flüssigkeitsmangel. Unter Wasserentzug muss ein Organismus in der Lage sein, bei gleichbleibender Ionenausscheidung das Urin-Volumen zu reduzieren, also weniger, dafür aber stärker konzentrierten Urin auszuschcheiden. Dies geschieht primär durch einen gesteigerten Aquaporin 2 (AQP2)-Einbau in apikale Membranen von renalen Sammelrohren, wodurch die Wasser-Rückresorption erhöht wird. Mit Hilfe von cGKII-KO- verglichen mit WT-Mäusen wurde untersucht, ob die cGKII bei der Regulation dieses gesteigerten AQP2-Einbaus beteiligt ist.

C.3.1.1 Urin-und Serum-Analytik

Bei Durstversuchen wurde den Mäusen im Stoffwechselkäfig für 18h Futter und Wasser entzogen und nachfolgend verschiedene Parameter in Urin und Serum bestimmt. Abb. 16 veranschaulicht die erhaltenen Ergebnisse, die dazugehörigen Werte sind in Tab. 9 festgehalten. Hierin ist ersichtlich, dass bei einer forcierten Urin-Aufkonzentrierung kein signifikanter Unterschied zwischen WT und cGKII-KO detektiert werden konnte. Das ausgeschiedene Urin-Volumen von KO-Mäusen schien tendenziell erniedrigt zu sein, dieser Unterschied erreichte jedoch, verglichen mit dem WT, keine statistische Signifikanz. Auch die Kalium-Konzentrationen im Urin unterschieden sich tendenziell voneinander, aufgrund der starken Schwankungen konnte jedoch auch hier keine statistische Signifikanz beobachtet werden.

	WT	KO
Urin-Volumen [μl/g(BW)/18h]	21,5 \pm 3,3	17,5 \pm 2,6
Urin [Na^+] [mM]	264,8 \pm 25,0	263,7 \pm 32,1
Urin [K^+] [mM]	297,8 \pm 71,6	453,0 \pm 84,7
UNa^+V [μmol/g(BW)/18h]	5,4 \pm 0,6	4,6 \pm 0,8
UK^+V [μmol/g(BW)/18h]	5,6 \pm 1,0	8,1 \pm 2,4
Serum [Na^+] [mM]	151,7 \pm 6,7	158,1 \pm 5,7
Serum [K^+] [mM]	6,6 \pm 0,3	6,1 \pm 0,3

Tab. 9: Metabolische Parameter unter Fasten-Bedingungen

Angabe gemittelter Werte \pm SEM, n=8 (WT) bzw. 7 (KO), BW: Körpergewicht), UNa^+V : Na^+ -Exkretion, UK^+V : K^+ -Exkretion. Weitere Erklärungen siehe Text.

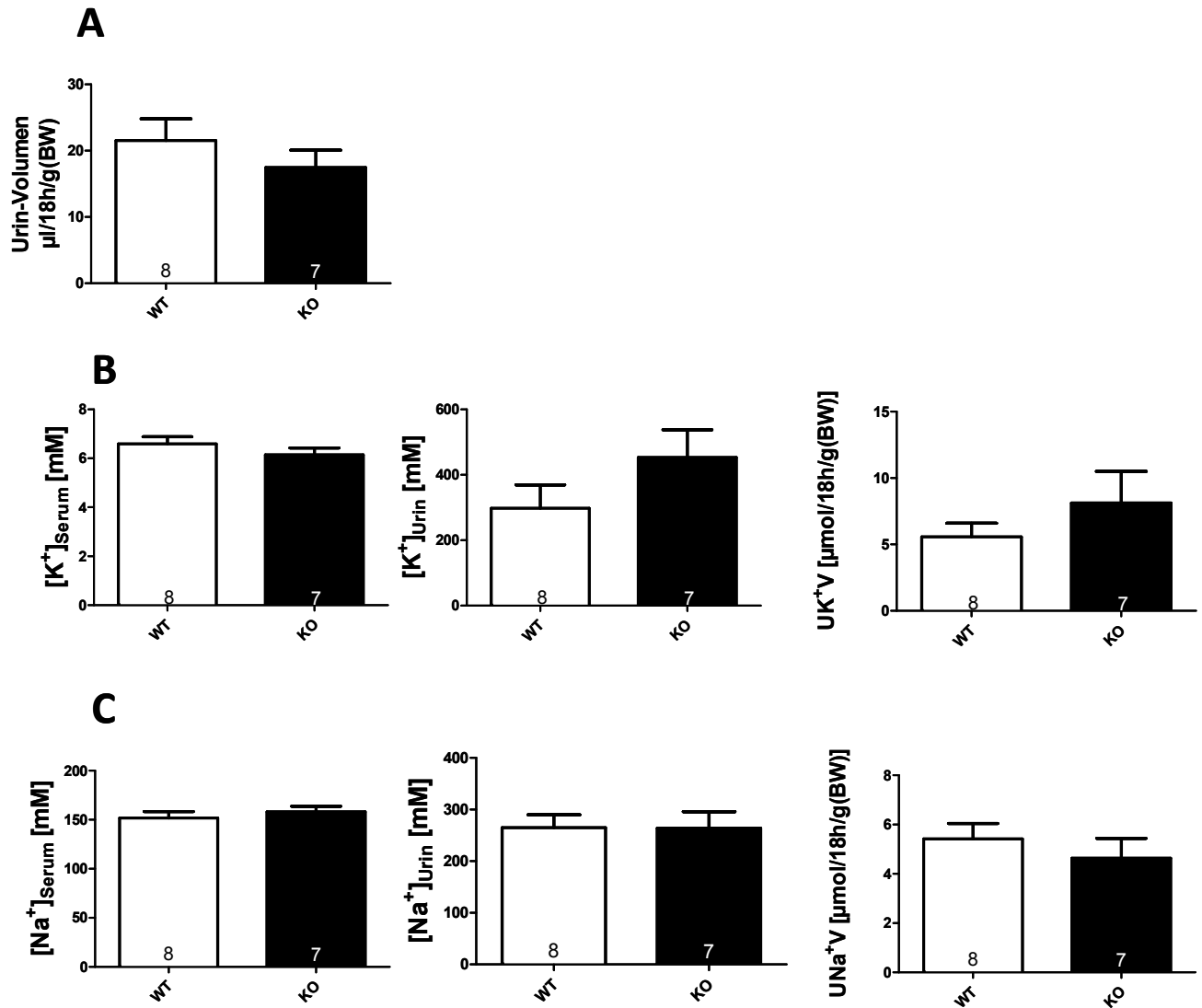


Abb. 16: Renale Parameter unter Wasser- und Futterentzug

Gesammelter Urin bzw. Serum wurde nach 18h bezüglich Urin-Volumen (A), Kalium-Exkretion (B) und Natrium-Exkretion (C) analysiert, $N=7-8$, wie in Säulen angegeben. UNa^+V : Na^+ -Exkretion, UK^+V : K^+ -Exkretion. Weitere Erklärungen siehe Text.

C.3.1.2 Immunhistochemische Analyse

Zusätzlich zu den Urin- und Serum-Untersuchungen wurden immunhistochemische Aufnahmen der AQP2-Verteilung nach Wasserentzug angefertigt (vgl. Abb. 17). Hierbei wurde als Ausschnitt der Übergang zwischen Medulla und Papille gewählt. Wie erwartet, zeigte sich nach 18h Wasserentzug eine starke luminal-membranäre Aquaporin-Expression. Diese konnte sowohl im WT als auch im KO beobachtet werden, womit die mittels der Stoffwechsel-Käfig-Untersuchungen erhaltenen Daten bzgl. des Urin-Volumens bestätigt wurden.

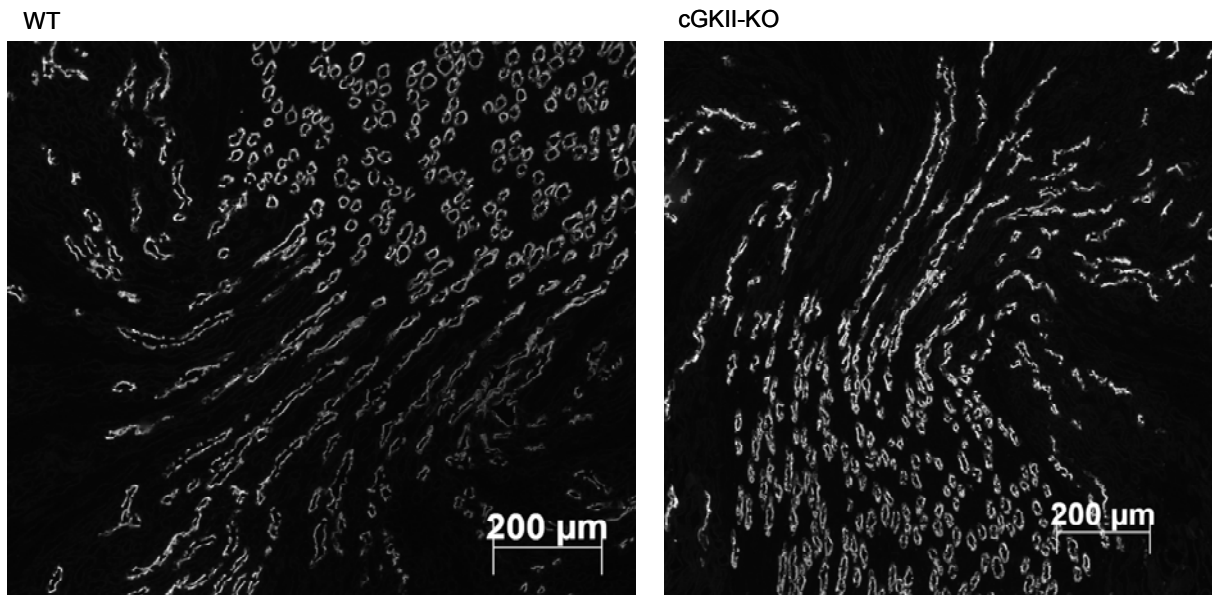


Abb. 17: Immunhistochemische Analyse von AQP2 nach 18h Wasserentzug

renale, PFA-fixierte Paraffinschnitte, AQP2/Cy2-gefärbt und unter 20facher Vergrößerung mikroskopiert. Gezeigt ist ein Ausschnitt aus dem Übergang zwischen äußerer und innerer Medulla. Weitere Erklärungen siehe Text.

C.3.2 Volumenexpansionsversuche

In den vorhergehenden Versuchen wurde gezeigt, dass WT als auch KO nach Wasserentzug eine vergleichbare Diurese sowie Ionen-Ausscheidung aufweisen und augenscheinlich den AQP2-Einbau in die Plasmamembran bei der forcierten Urinaufkonzentrierung gleichermaßen regulieren können. Bei den nachfolgenden Versuchen wurde untersucht, ob ein Fehlen der cGKII die Osmo- bzw. Volumenregulation beeinflusst. Hierzu wurde WT- bzw. cGKII-KO-Tieren mittels Schlundsondierung eine hypertone, isotone sowie hypotone Lösung verabreicht und nachfolgend zunächst Volumen und Ionenkonzentrationen des im Stoffwechsel-Käfig gesammelten Urins bestimmt.

C.3.2.1 Vorversuch

Bevor die eigentlichen Versuche gestartet wurden, wurde zuerst ein Vorversuch durchgeführt, in dem die optimale Menge an appliziertem Volumen ermittelt wurde. Hierzu wurde WT-Mäusen entweder die Schlundsonde eingeführt, ohne eine Lösung zu applizieren (sham-Kontrolle: N=10), oder 3% vom Körpergewicht (BW) einer 10mM Glucose-Lösung (Water Load (WL) 3% v. BW: N=10) bzw. 2 x 3% vom KG der gleichen Lösung mit einstündigem Abstand (WL 2 x 3% v. BW: N=4) appliziert. Der Urin wurde über einen Zeitraum von 6h gesammelt und anschließend das Urin-Volumen gemessen (vgl. Abb. 18). Es zeigte sich, dass das Urin-Volumen bereits bei der einmaligen Applikation von 3% v. BW dieser Lösung höchst signifikant gesteigert wird, so dass alle nachfolgenden Versuche unter dieser Bedingung durchgeführt wurden.

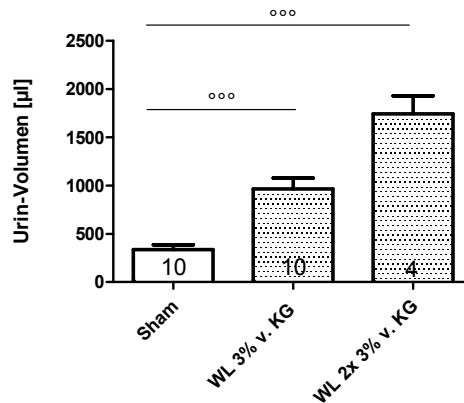


Abb. 18: Urin-Menge in Abh. des applizierten Volumens

Gesammelter Urin von WT-Gruppen nach 6h Sammelzeit, N=4-10, wie in Säulen angegeben. Weitere Erklärungen siehe Text.

C.3.2.2 Verabreichung einer isotonen Lösung (Volumenregulation)

Während einer Hypervolämie wird vermehrt ANP aus den Atrien ausgeschüttet, das letztlich zu einer verstärkten Diurese und Natriurese führt. Um zu überprüfen, ob die cGKII an der Regulation dieser Prozesse beteiligt ist, wurde WT- und KO-Mäusen 0,9% NaCl-Lösung verabreicht und Diurese sowie Natriurese innerhalb der folgenden 6h analysiert. Abb. 19 veranschaulicht die erhaltenen Werte. Wie erwartet stiegen Urin-Volumen und Natrium-Ausscheidung im WT signifikant an, eine analoge Steigerung konnte ebenfalls beim cGKII-KO beobachtet werden. Zwar erschienen die Natrium-Molmengen nach Induktion der Hypervolämie im Urin von KO-Tieren im Vergleich zum WT tendenziell erniedrigt, dieser Unterschied erreichte jedoch keine statistische Signifikanz.

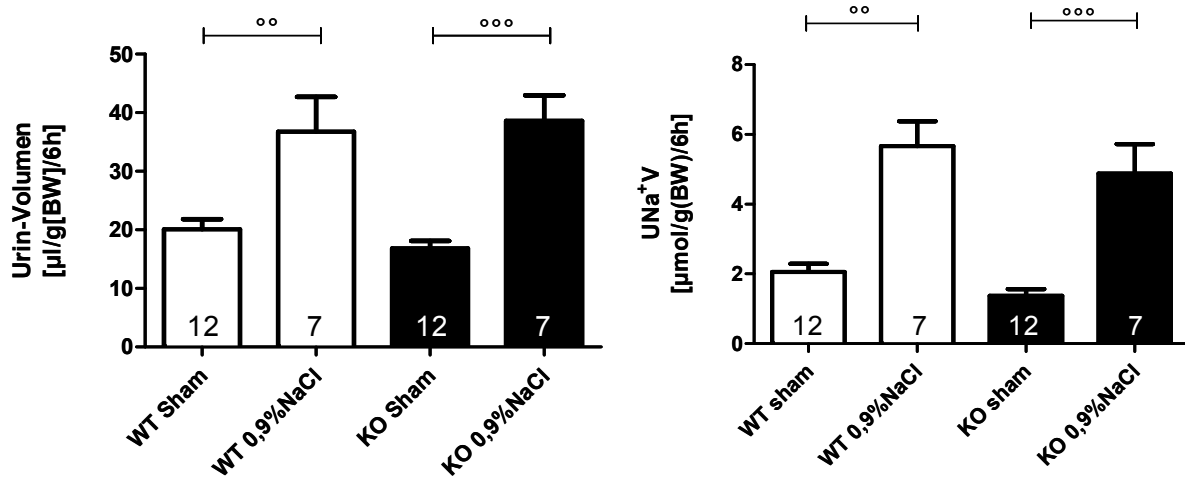


Abb. 19: Urin-Volumen und Natrium-Molmengen nach Verabreichung einer isotonen Lösung

Schlundsondierung mit 3% des Körpergewichts einer 0,9% NaCl-Lösung, als Kontrollen wurden sham-behandelte Tiere verwendet. Gesammelter Urin wurde nach 6h bezüglich Urin-Volumen (links) und Natrium-Exkretion (rechts) analysiert, N=7-12, wie in Säulen angegeben. UNa⁺V: Na⁺-Exkretion, BW: Körpergewicht. Weitere Erklärungen siehe Text.

C.3.2.3 Verabreichung einer hypertonen Lösung (Osmoregulation, Salt Load)

Nachdem zunächst die Volumenregulation bezüglich Diurese und Natriurese im cGKII-KO untersucht wurde, sollte nachfolgend die Osmoregulation im Fokus stehen. Um eine Hypertonie des Serums hervorzurufen, wurde den Mäusen in Analogie zu den Hoch-Salz-Diäten per Schlundsonde eine 4%-ige Kochsalz-Lösung appliziert. Wie in Abb. 20 gezeigt (WT sham: N=12, WT 4% NaCl: N=4, KO sham: N=12, KO 4% NaCl: N=4), reagierten WT und KO auf diesen Salt-Load gleichermaßen mit einer um das 2,5-fache erhöhten Diurese sowie einer um das 9-fache erhöhten Natriurese, Unterschiede zwischen den Genotypen bzgl. der analysierten Parameter konnten nicht detektiert werden.

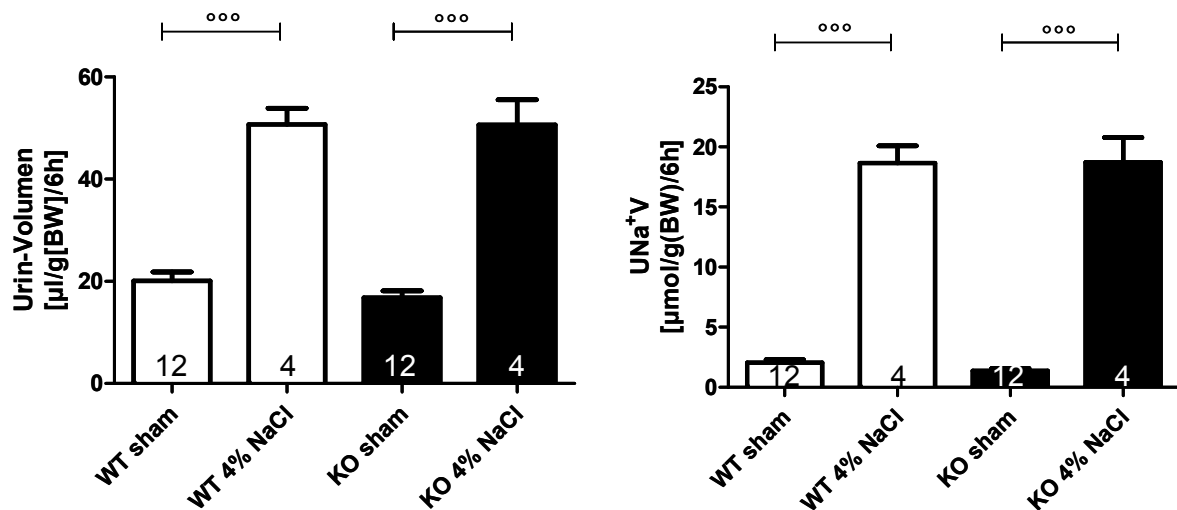


Abb. 20: Urin-Volumen und Natrium-Molmengen nach Verabreichung einer hypertonen Lösung
 Schlundsondierung mit 3% des Körpergewichts einer 4% NaCl-Lösung, als Kontrollen wurden sham-behandelte Tiere verwendet. Gesammelter Urin wurde nach 6h bezüglich Urin-Volumen (links) und Natrium-Exkretion (rechts) analysiert, N=4-12, wie in Säulen angegeben. UNa⁺V: Na⁺-Exkretion, BW: Körpergewicht. Weitere Erklärungen siehe Text.

C.3.2.4 Verabreichung einer hypotonen Lösung (Osmoregulation, Water Load)

Schließlich wurde eine forcierte Urin-Verdünnung nach Volumenexpansion herbeigeführt, indem den Mäusen eine 10mM Glucose-Lösung per Schlundsonde appliziert und somit eine Hypoosmolalität des Serums herbeigeführt wurde. Abb. 21 demonstriert die Diurese bzw. Natriurese unter dieser gewählten Bedingung (WT sham: N=12, WT WL: N=14, KO sham: N=12, KO WL: N=14). Wie erwartet, stieg die Diurese im WT nach WL signifikant an. Im cGKII-KO war im Vergleich zur sham-Kontrolle ebenfalls eine signifikante Zunahme der Diurese zu beobachten, allerdings war diese Zunahme im KO, verglichen mit dem WT, signifikant schwächer ausgeprägt.

Um das überschüssige Wasser-Volumen aus dem Organismus wieder auszuschcheiden, wird der luminale Membran-Einbau von AQP2 in den Sammelrohren unterbunden. Die im Vergleich zum WT verminderte Diurese in cGKII-KO-Mäusen lieferte einen ersten Hinweis auf eine mögliche Beteiligung der cGKII an der Hemmung des AQP2-Membran-Transports, so dass im Folgenden eine detailliertere Analyse durchgeführt wurde (siehe C.3.3, S.70). Neben der Diurese zeigten cGKII-KO-Tiere im Rahmen der hypoosmolaren Volumenexpansion ebenfalls eine veränderte Natriurese. Im WT führte die Schlundsondierung mit hypotoner Lösung zu keiner Änderung der Natriumausscheidung. Auch im KO blieb die Natriurese vergleichbar mit der der sham-Kontrollen, allerdings schieden die cGKII-KO-Mäuse sowohl unter Kontroll-Bedingungen als auch unter WL-Bedingungen, verglichen mit dem WT, nur 66% Natrium aus. Auch dieser Befund sollte nachfolgend näher charakterisiert werden.

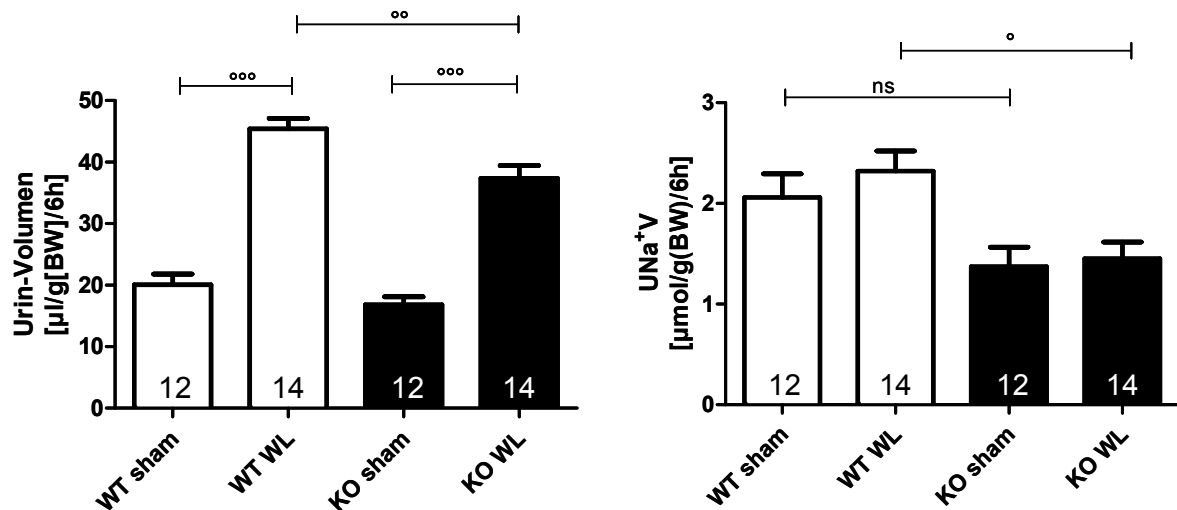


Abb. 21: Urin-Volumen und Natrium-Molmengen nach Verabreichung einer hypotonen Lösung

Schlundsondierung mit 3% des Körpergewichts einer 10mM Glucose-Lösung, als Kontrollen wurden sham-behandelte Tiere verwendet. Gesammelter Urin wurde nach 6h bezüglich Urin-Volumen (links) und Natrium-Exkretion (rechts) analysiert, N=12-14, wie in Säulen angegeben. Signifikante Unterschiede sind mit ° gekennzeichnet (ANOVA, °: $p < 0,05$, °° $p < 0,01$, °°° $p < 0,001$). UNa⁺V: Na⁺-Exkretion, BW: Körpergewicht. Weitere Erklärungen siehe Text.

C.3.2.5 Analyse der Kalium-Molmengen

Neben Diurese und Natriurese wurde bei den gewählten Bedingungen zusätzlich die Kaliurese untersucht (vgl. Abb. 22). Hierbei konnte im WT mit Ausnahme der Applikation von 4%-NaCl-Lösung keine Steigerung der Kalium-Exkretion beobachtet werden. Ein vergleichbares Bild zeigte sich auch im KO (N-Zahlen analog oben).

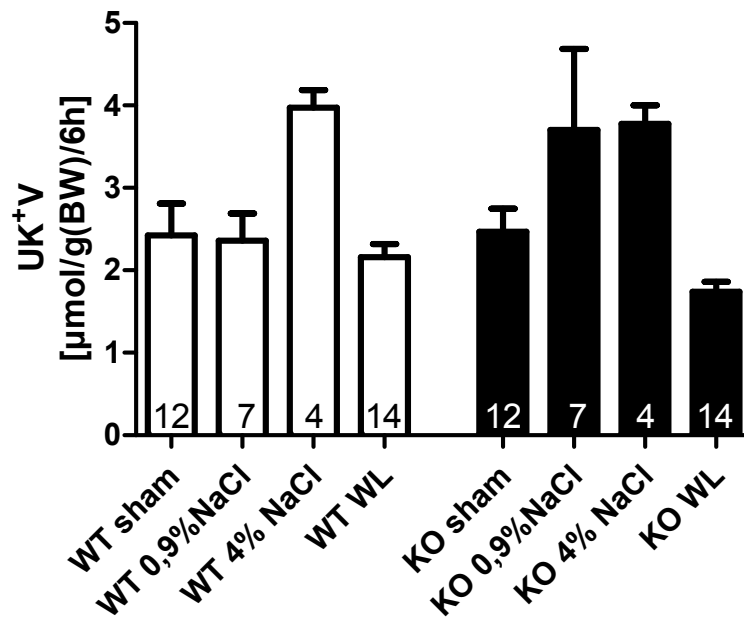


Abb. 22: Kalium-Molmengen nach Applikation osmolar-unterschiedlicher Lösungen

Schlundsondierung mit 3% des BWs von Lösungen unterschiedlicher Osmolarität, als Kontrollen wurden sham-behandelte Tiere verwendet. Gesammelter Urin wurde nach 6h bezüglich Kalium-Exkretion (UK⁺V) analysiert, N=4-14, wie in Säulen angegeben, BW: Körpergewicht. Weitere Erklärungen siehe Text.

C.3.3 Detaillierte Analyse der Urin-Ausscheidung unter forcierter hypotoner Osmoregulation

Nachdem im cGKII-KO eine eingeschränkte diuretische Antwort auf die Applikation einer hypotonen Lösung beobachtet worden war, wurde der Urin im Folgenden hinsichtlich verschiedener Parameter genauer charakterisiert.

C.3.3.1 Urin- Analyse

WT-Mäuse, bei denen der Water Load induziert wurde, waren in der Lage, 96% des applizierten Flüssigkeits-Volumens binnen der ersten 2h nach WL wieder auszuscheiden. Im Gegensatz dazu schieden sham-behandelte Mäuse innerhalb dieser Zeit häufig keinen Urin aus, so dass es nötig war, die Sammeldauer zu erhöhen. Um Kontroll-Werte der sham-behandelten Tiere zu erhalten, wurde der Urin in 2h-Intervallen insgesamt über 6h gesammelt und das Urin-Volumen sowie die aus den Einzelkonzentrationen errechneten Ionenmengen schließlich aufaddiert. Abb. 23 veranschaulicht die Ergebnisse bzgl. Urin-Volumen sowie Natrium-, Chlorid- und Kalium-Molmengen, eine exakte Auflistung der erhaltenen Werte findet sich in Tab. 10. Wie bereits auf S. 68 dargelegt, waren im Falle einer hypotonen Volumenexpansion Diurese und Natriurese von cGKII-KO-Mäusen, verglichen mit dem WT, signifikant vermindert. Weiterhin zeigte sich, dass während einer forcierter hypotonen Osmoregulation auch die Exkretion von Chlorid und Kalium tendenziell erniedrigt war.

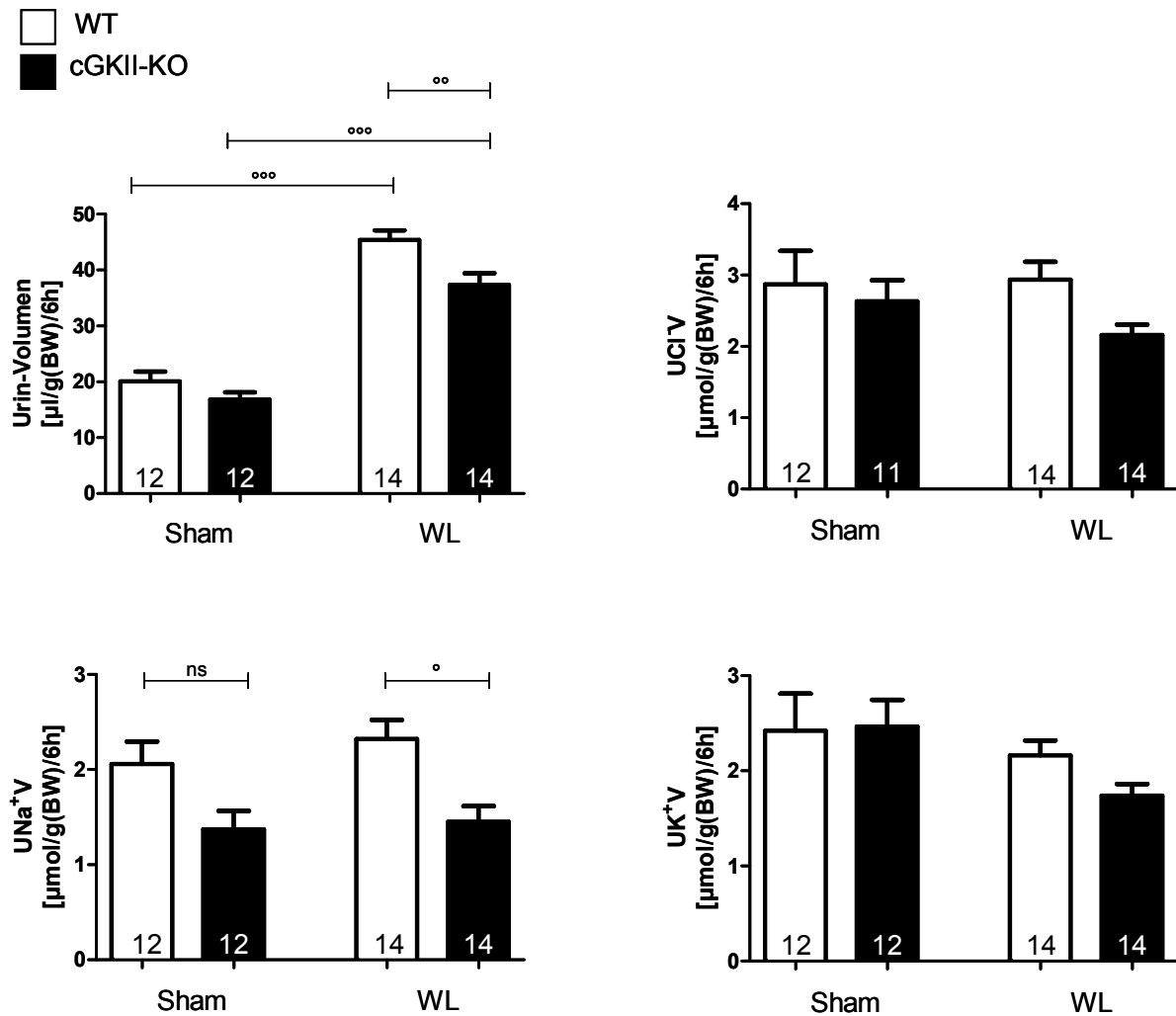


Abb. 23: Kumulative Auftragung der erhaltenen Urin-Parameter nach WL

Schlundsondierung mit 3% des Körpergewichts einer 10mM Glucose-Lösung, als Kontrollen wurden sham-behandelte Tiere verwendet. Urin wurde in 2h-Intervallen über 6h gesammelt und kumulativ bezüglich Urin-Volumen und Ionenausscheidung analysiert, N=11-14, wie in Säulen angegeben. Signifikante Unterschiede sind mit ° gekennzeichnet (ANOVA, °: $p < 0,05$, °° $p < 0,01$, °°° $p < 0,001$). UNa⁺V: Na⁺-Exkretion, UK⁺V: K⁺-Exkretion, UClV: Cl⁻-Exkretion, BW: Körpergewicht. Weitere Erklärungen siehe Text.

	WT sham	WT WL	KO sham	KO WL
Urin-Vol. [$\mu\text{l/g(BW)}/6\text{h}$]	20,07 \pm 1,7	45,4 \pm 1,7 ^{°°°}	16,8 \pm 1,3	37,37 \pm 2,1 ^{°°°} ¶¶
UNa ⁺ V [$\mu\text{mol/g(BW)}/6\text{h}$]	2,06 \pm 0,2	2,32 \pm 0,2	1,37 \pm 0,2	1,45 \pm 0,2 ¶
UK ⁺ V [$\mu\text{mol/g(BW)}/6\text{h}$]	2,42 \pm 0,4	2,16 \pm 0,2	2,47 \pm 0,3	1,74 \pm 0,1
UClV [$\mu\text{mol/g(BW)}/6\text{h}$]	2,87 \pm 0,5	2,94 \pm 0,3	2,63 \pm 0,3	2,16 \pm 0,1

Tab. 10: Tabellarische Auflistung der nach WL errechneten kumulativen Werte

Angabe gemittelter Werte \pm SEM, n=12-14/Gruppe, BW: Körpergewicht), UNa⁺V: Na⁺-Exkretion, UK⁺V: K⁺-Exkretion, UClV: Cl⁻-Exkretion. Statistisch signifikante Unterschiede sind mit °°°(ANOVA, $p < 0,001$, Vergleich von unterschiedlich behandelten Gruppen gleichen Genotyps) bzw. ¶ (ANOVA, $p < 0,05$ bzw. ¶¶ mit $p < 0,01$ Vergleich unterschiedlicher Genotypen mit gleicher Behandlung) markiert. Weitere Erklärungen siehe Text.

In der ersten Sammelperiode (2h) konnte Urin von sämtlichen Mäusen beider Tiergruppen nach WL gesammelt und analysiert werden. Der direkte Vergleich der volumenexpandierten Tiere ermöglicht, die unmittelbare renale Reaktion nicht-kumulativ zu beurteilen. Abb. 24 illustriert die erhaltenen Ergebnisse, eine tabellarische Auflistung findet sich in Tab. 11. Hier zeigte sich, dass cGKII-KO-Mäuse in der unmittelbaren Antwort signifikante Defizite bzgl. Wasser-, Natrium- und Chloridausscheidung aufwiesen. Diese Unterschiede sollten nachfolgend mechanistisch näher charakterisiert werden. Neben den abgebildeten Parametern wurde in den 2h-Urinen zusätzlich Osmolalität, pH und Kreatinin-Menge bestimmt, jedoch keine Unterschiede innerhalb der Genotypen beobachtet. Die erhaltenen Werte finden sich in Tab. 11 wieder.

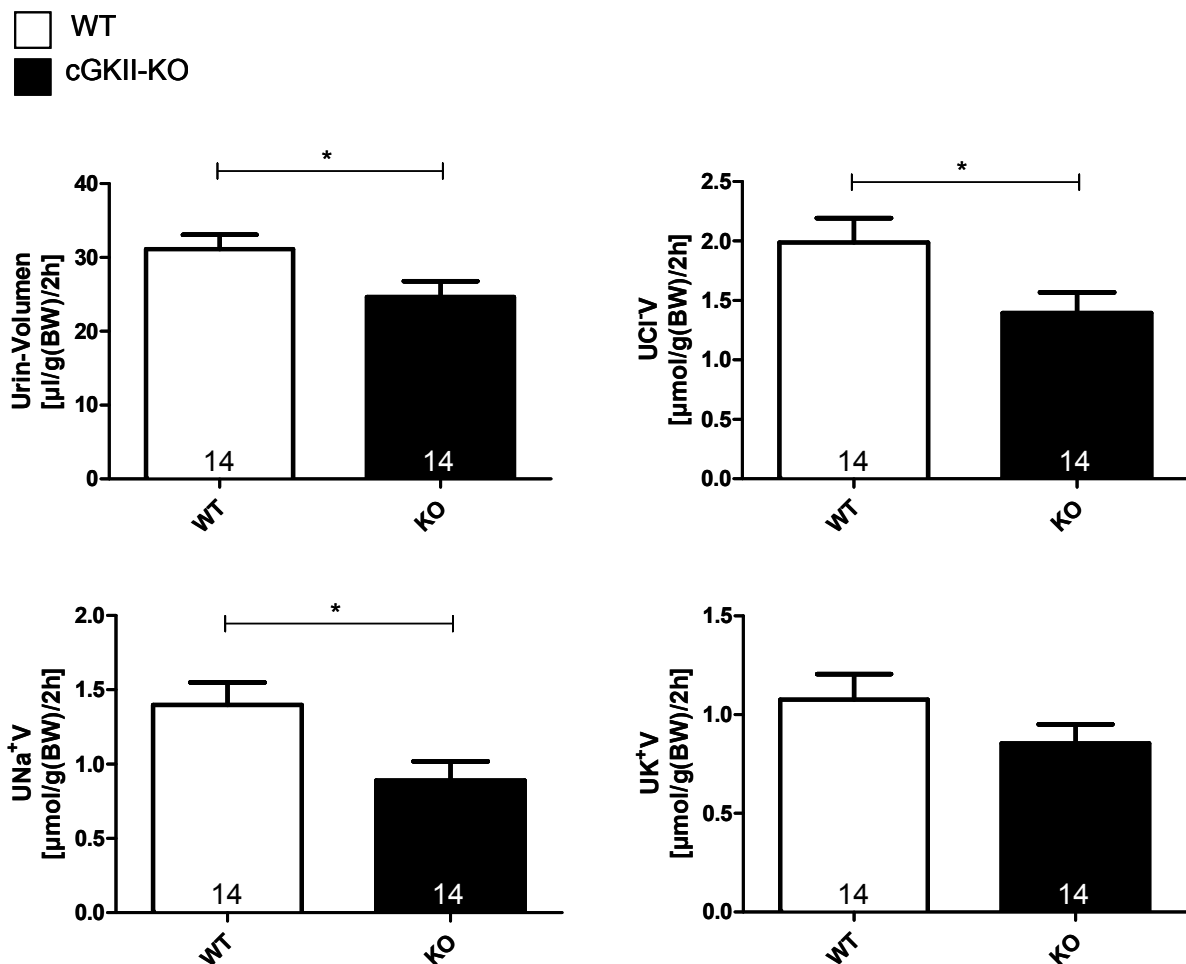


Abb. 24: Nicht-kumulative 2h- Auftragung der erhaltenen Urin-Parameter nach WL

Schlundsondierung mit 3% des Körpergewichts einer 10mM Glucose-Lösung, als Kontrollen wurden sham-behandelte Tiere verwendet. Gesammelter Urin wurde nach 2h bezüglich Urin-Volumen und Ionenausscheidung analysiert, N=14/Tiergruppe, wie in Säulen angegeben. Signifikante Unterschiede sind mit * gekennzeichnet (t-Test, *: $p < 0,05$). UNa⁺V: Na⁺-Exkretion, UK⁺V: K⁺-Exkretion, UClV: Cl⁻-Exkretion, BW: Körpergewicht. Weitere Erklärungen siehe Text.

	WT WL	KO WL
Urin-Vol. [$\mu\text{l/g(BW)}/2\text{h}$]	31,12 \pm 2,0	24,65 \pm 2,1 *
Urin [Na^+] [mM]	44,45 \pm 3,7	36,51 \pm 4,8
Urin [K^+] [mM]	34,32 \pm 3,3	38,20 \pm 5,7
Urin [Cl^-] [mM]	62,86 \pm 4,4	58,64 \pm 7,6
UNa ⁺ V [$\mu\text{mol/g(BW)}/2\text{h}$]	1,40 \pm 0,2	0,89 \pm 0,1 *
UK ⁺ V [$\mu\text{mol/g(BW)}/2\text{h}$]	1,08 \pm 0,1	0,85 \pm 0,1
UCI ⁻ V [$\mu\text{mol/g(BW)}/2\text{h}$]	1,99 \pm 0,2	1,39 \pm 0,2 *
Osmolalität [mosmol/kg/2h]	375,9 \pm 30,4	388,6 \pm 46,8
UKreaV [$\mu\text{g/g(BW)}/2\text{h}$]	2,25 \pm 0,1	1,96 \pm 0,2
pH	7,1 \pm 0,1	7,0 \pm 0,1

Tab. 11: Tabellarische Auflistung der nach der ersten Sammelperiode ermittelten WL-Werte

Angabe gemittelter Werte \pm SEM, n=14/Gruppe, BW: Körpergewicht, UNa⁺V: Na⁺-Exkretion, UK⁺V: K⁺-Exkretion, UCI⁻V: Cl⁻-Exkretion, UKreaV: Kreatinin-Exkretion. Statistisch signifikante Unterschiede sind mit * (t-Test, p<0,05) markiert. Weitere Erklärungen siehe Text.

C.3.3.2 Bestimmung des Blutdrucks

Als Nächstes wurde untersucht, ob die orale Volumenexpansion zu Änderungen des Blutdrucks führt. Hierzu wurden die Tiere zunächst mehrere Tage in die Tail-Cuff-Anlage eingewöhnt und schließlich je 1h nach WL systolischer, diastolischer und mittlerer arterieller Blutdruck sowie die Herzfrequenz bei einer Umgebungstemperatur von 39°C ermittelt (vgl. Abb. 25). Es zeigte sich, dass Blutdruck und Herzfrequenz sowohl im WT als auch im KO durch die Applikation von hypotoner Lösung unbeeinflusst blieb.

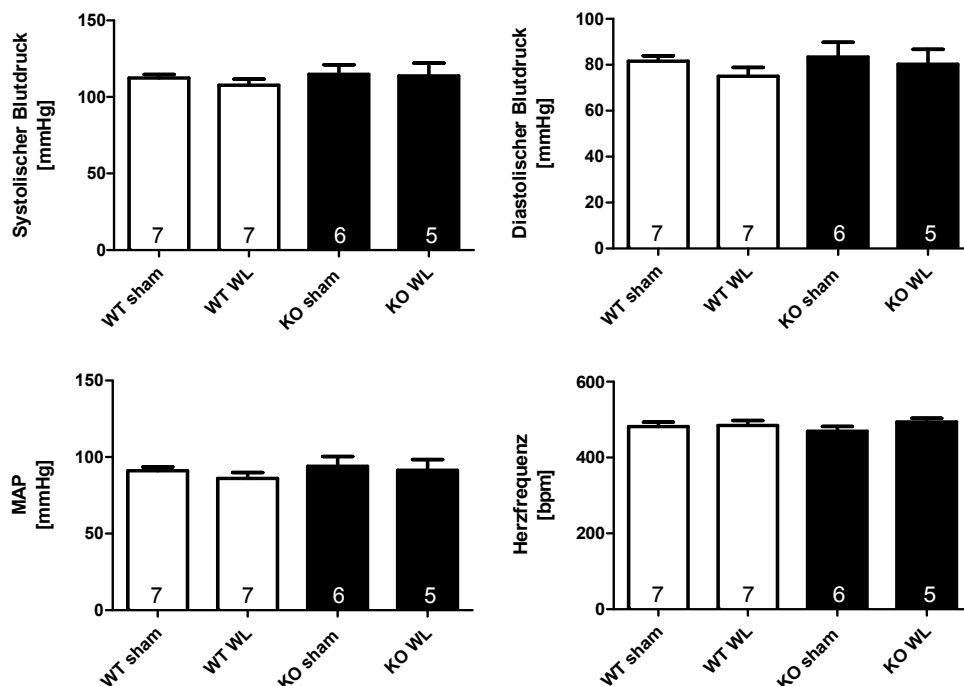


Abb. 25: Blutdruck-Analyse bei volumenexpandierten Mäusen im Vergleich zu sham-Kontrollen

Schlundsondierung mit 3% des Körpergewichts einer 10mM Glucose-Lösung; als Kontrollen wurden sham-behandelte Tiere verwendet. Blutdruck und Puls wurde an der Arteria caudalis nicht-invasiv vermessen und MAP bzw. Herzfrequenz daraus errechnet. N=5-7, wie in Säulen angegeben. MAP: mean arterial pressure. Weitere Erklärungen siehe Text.

C.3.3.3 Untersuchung der cGMP-, Aldosteron- und Vasopressin- Spiegel

Die Regulation der Feineinstellung von Natriurese und Diurese im Sammelrohr unterliegt zuallererst den beiden Hormonen Aldosteron und Vasopressin (AVP). Es wäre denkbar, dass der Defekt der cGKII-KO-Mäuse bzgl. der Osmoregulation nach Verabreichung einer hypotonen Lösung auf unterschiedliche Hormon-Spiegel zurückzuführen wäre. Aus diesem Grund wurde im Nachfolgenden mittels ELISA die Konzentration von Aldosteron im Serum sowie die Konzentration von Vasopressin im Urin bestimmt. Weiterhin wurden die cGMP-Konzentrationen in renalem Gewebe sowie im Urin ermittelt, um zu überprüfen, ob die beobachteten Defizite cGMP-abhängig gesteuerte Prozesse beinhalten. Abb. 26 illustriert die erhaltenen Ergebnisse. Bezüglich der cGMP-Spiegel war festzustellen, dass diese sowohl im Gewebe (A) als auch im Urin (B) bei beiden Genotypen nach WL leicht, wenn auch nicht signifikant, anstiegen (cGMP im Urin von KO Tieren sham vs. WL (t-test: $p = 0,059$). Die Aldosteron-Konzentration im Serum (C) war im WT nach WL signifikant gesteigert, im cGKII bereits basal unter sham-Bedingungen verglichen mit dem WT tendenziell erhöht (Signifikanz-Analyse mittels ANOVA durchgeführt, bei Vergleich der beiden sham-behandelten Genotypen im t-Test wurde Signifikanz erreicht, $p < 0,05$). Die Aldosteronkonzentrationen beider Genotypen nach WL unterschieden sich nicht. Bei der Analyse der Vasopressin-Sekretion zeigte sich, dass diese weder beim WT noch beim KO infolge einer hypotonen Volumenexpansion vermindert wird. Tendenziell neigte der KO generell zu einer leicht erhöhten Vasopressin-Konzentration im Urin. Hier muss bemerkt werden, dass die im ELISA erhaltene Vasopressin-Konzentration auf die Kreatinin-Konzentration im Urin normalisiert wurde. Da diese im KO, verglichen zum WT, leicht erniedrigt war (vgl. Tab. 11), ist die Erhöhung der Vasopressin-Konzentration rechnerisch auf eine veränderte Kreatininmenge zurückzuführen.

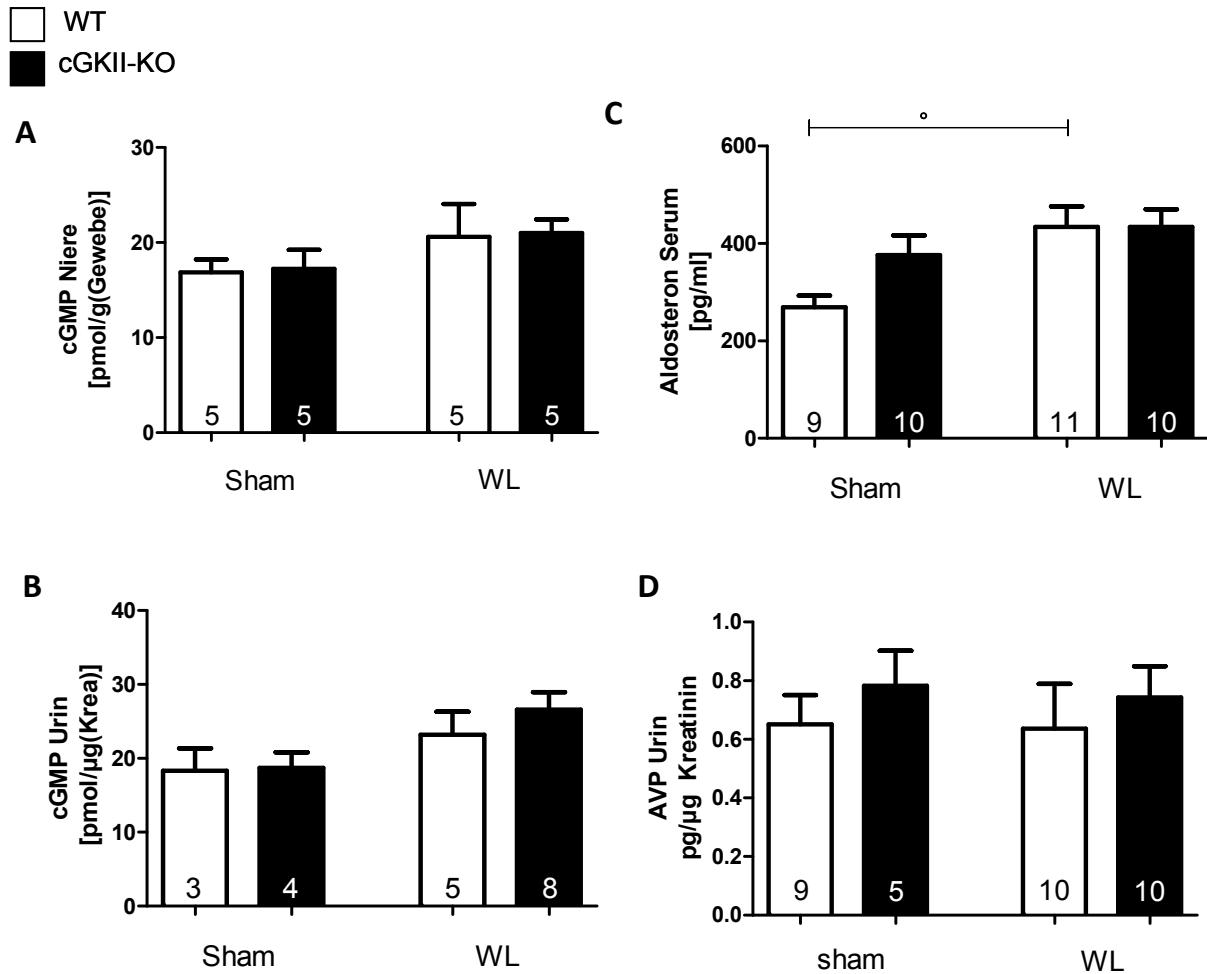


Abb. 26: cGMP-, Aldosteron- und Vasopressin Konzentrationen nach hypotoner Volumenexpansion

Schlundsondierung mit 3% des Körpergewichts einer 10mM Glucose-Lösung, als Kontrollen wurden sham-behandelte Tiere verwendet. Nachfolgende Analyse der cGMP-Spiegel (A, B), der Aldosteron-Konzentration im Serum (C) und Vasopressin (AVP)-Exkretion (D) mittels ELISA. $N = 3-11$, wie in Säulen angegeben. Signifikante Unterschiede sind mit ° gekennzeichnet (ANOVA, °: $p < 0,05$). Weitere Erklärungen siehe Text.

C.3.4 Untersuchung renaler Downstream-Effektoren der cGKII

Im Vorfeld konnten veränderte Hormonkonzentrationen von Vasopressin und Aldosteron als Ursache für die gestörte hypotone Osmoregulation im cGKII-KO ausgeschlossen werden, auch eine defekte cGMP-Synthese stellte sich nicht als Grund heraus. Als Nächstes wurden deshalb mögliche Downstream-Effektor-Proteine gesucht, die eine gestörte Natriurese oder Diurese bewirken könnten.

C.3.4.1 ENaC

Das Ansteigen der Aldosteron-Spiegel nach Volumenexpansion deutete auf eine Beteiligung des epithelialen Natrium-Kanals bei der beobachteten Natrium-Ausscheidung hin (Abb. 24). Im Folgenden wurde deshalb ENaC weiterführend untersucht.

C.3.4.1.1 Qualitative und quantitative Analyse der Membranlokalisation mittels IHC und WB

Zunächst wurde die Plasmamembran (PM)-Verteilung von ENaC in medullären Nierenbereichen untersucht (Abb. 27). Hierzu wurden von allen Versuchsgruppen die Plasmamembranen medullärer Nieren-Fragmente mittels differentieller Zentrifugation gewonnen und densitometrisch analysiert. Es wurde deutlich, dass die medulläre PM-Verteilung von ENaC im WT wie auch im KO unbeeinflusst von der hypotonen Volumenexpansion blieb und wie unter Kontrollbedingungen bei um 100% lag.

Weiterhin wurden mittels immunologischer Methoden Protein-Menge und Zell-Lokalisierung von ENaC untersucht. Der hierfür verwendete Antikörper wurde freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. Korbmacher (Erlangen) bzw. Herrn Prof. Dr. Castrop (Regensburg) zur Verfügung gestellt. Abb. 28 zeigt exemplarische Beispiele immunhistochemischer Gesamtbild-Aufnahmen von WT- und KO-Nieren. Die Aufnahmen erfolgten am AxioObserver Z1, Objektiv EC Plan-Neofluar 20x/0.50 Ph 2 M27, Cy5-Kanal, bei jeweils gleicher Belichtungszeit von 1560ms (N=3 pro Tiergruppe). Während die ENaC-Expression unter sham-Bedingungen im WT nur schwach ausgeprägt und auf cortikale Bereiche beschränkt war (Distale Tubulus-Verbindungsstücke, DCT), konnte 30min nach WL eine Hochregulierung der ENaC-Expression sowohl im Cortex als auch in äußer-medulläre Bereiche (outer medullary collecting duct, OMCD) beobachtet werden. Die Analyse von KO-Schnitten zeigte ein ähnliches Bild, wenngleich unter sham-Bedingungen vereinzelt bereits schwache Signale im OMCD detektiert wurden. Die WL-induzierte Hochregulierung im WT konnte ebenfalls im KO gezeigt werden.

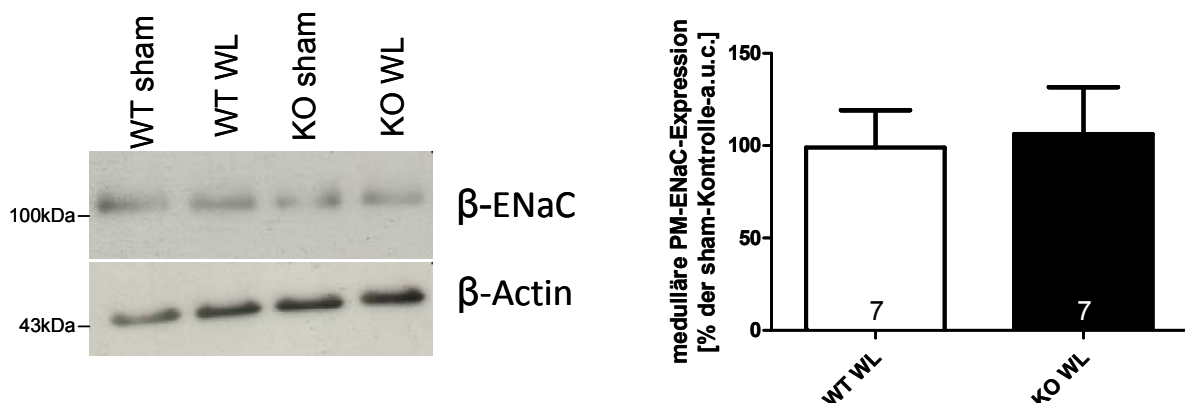


Abb. 27: Die medulläre ENaC-Plasmamembran-Verteilung

Links: SDS-Gel-Analyse/Western Blot mit je 70µg Gesamtprotein aus medullären PM-Fraktionen. Verwendete Antikörper: β -EnaC, β -Actin (Ladungskontrolle). Rechts: Densitometrische Analyse, wobei die erhaltenen ENaC-Intensitäten auf β -Actin normalisiert und auf die jeweilige sham-Kontrolle bezogen wurden. Weitere Erklärungen siehe Text.

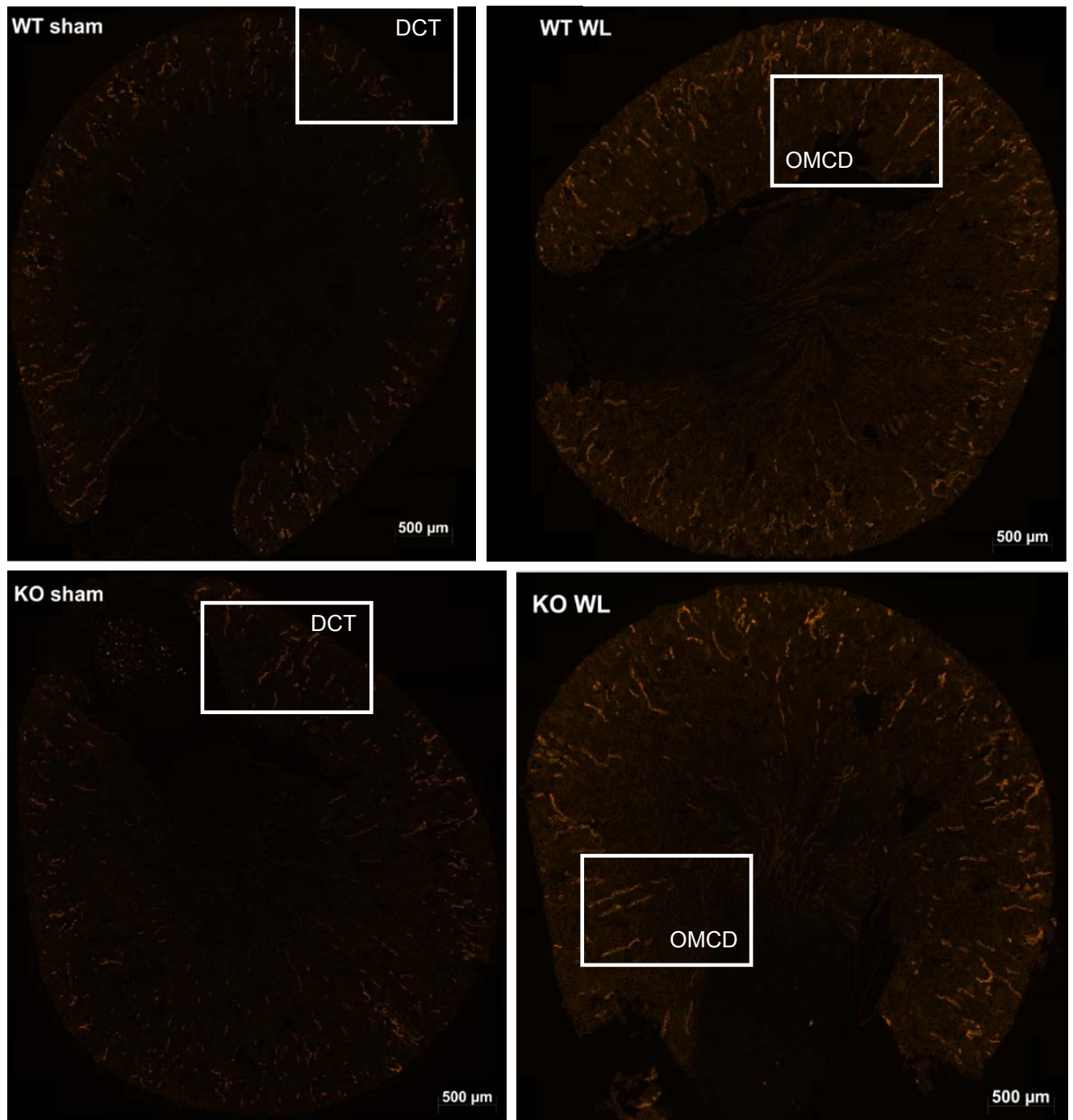


Abb. 28: Immunhistochemische Analyse der renalen ENaC-Expression vor und nach WL
renale, PFA-fixierte Paraffinschnitte, β -ENaC/Alexa647-gefärbt und unter 20facher Vergrößerung mikroskopiert.
DCT: distal connecting tubules, IMCD: inner medullary collecting duct, OMCD: outer medullary collecting duct.
Weitere Erklärungen siehe Text.

C.3.4.1.2 Pharmakologische Beeinflussung mittels Amilorid

Um zu überprüfen, ob die verminderte Natriumausscheidung im cGKII-KO unter WL-Bedingungen durch eine verminderte Hemmung der Aktivität von ENaC und demzufolge einer erhöhten Natriumrückresorption verursacht wurde, wurden Versuche mit dem ENaC-inhibierenden Diuretikum Amilorid durchgeführt. Hierbei wurde den Mäusen bei gleichzeitiger Volumenexpansion zusätzlich Amilorid (6mg/kg/d) mittels Schlundsondierung appliziert. Vorversuche im Vergleich zu intraperitonealer Applikation machten deutlich, dass die gewählte Applikationsmethode ebenfalls zu einer signifikanten Steigerung der Natriurese im WT führte, allerdings den Vorteil hatte, dass die Mäuse nicht durch eine zusätzliche i.p.-Injektion einem weiteren Stress-Faktor ausgesetzt wurden. Abb. 29 veranschaulicht die erhaltenen Ergebnisse bezüglich Diurese und Natriurese. Die diuretische Antwort fiel bei beiden Genotypen wie erwartet verzögert und schwach ausgeprägt aus. Im Gegensatz dazu kam es sowohl im WT als auch im KO innerhalb der ersten 2h nach Schlundsondierung zu einer signifikanten Steigerung der Natriurese. Die erhaltenen Werte für KO-Tiere erreichten jedoch auch nach 6h Urinsammlung nicht völlig die Werte vom WT (WT WL Ami: $4,38 \pm 0,3 \mu\text{mol/g(BW)}/6\text{h}$; KO WL Ami: $3,85 \pm 0,40,3 \mu\text{mol/g(BW)}/6\text{h}$), so dass davon ausgegangen werden muss, dass neben ENaC noch weitere Natrium-Transportproteine an der veränderten Natriurese im cGKII-KO beteiligt sind.

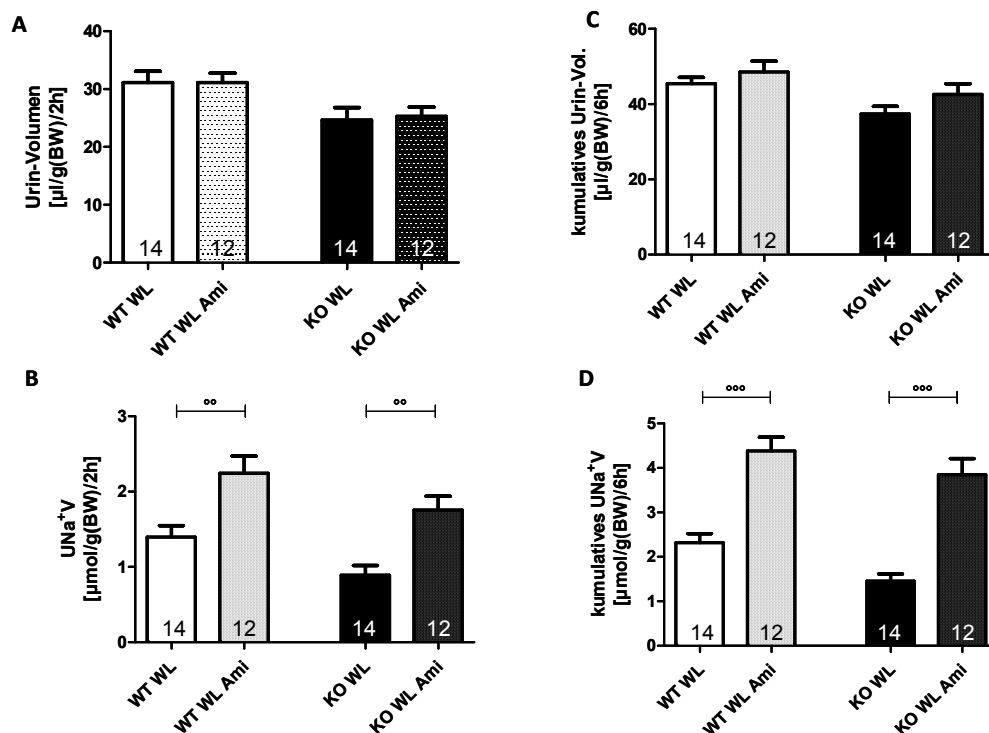


Abb. 29: Diuretische und natriuretische Antwort auf WL bei gleichzeitiger Amilorid-Applikation

Schlundsondierung mit 3% des BWs einer 10mM Glucose-Lösung mit 6mg/kg/d Amilorid, als Kontrollen wurden WL-Tiere verwendet. Gesammelter Urin wurde nach 2h (A,B) bzw. kumulativ nach 6h (C,D) bezüglich Urin-Volumen und Natrium-Ausscheidung analysiert, N=12-14, wie in Säulen angegeben. Signifikante Unterschiede sind mit * gekennzeichnet (ANOVA, °°°: $p < 0,001$). Ami: Amilorid, UNaV: Na-Exkretion, BW: Körpergewicht.

Weitere Erklärungen siehe Text.

C.3.4.2 Aquaporin 2

Nachfolgend wurden die physiologisch analysierten diuretischen Defekte im cGKII-KO näher untersucht. Die Wasserrückresorption im Sammelrohr obliegt luminal dem Wasserkanal Aquaporin 2 (AQP2). Bei Bedingungen, die eine geringe Wasserrückresorption erforderlich machen, erfolgt die „Hemmung“ dieses Kanals, wie eingangs erläutert, basierend auf der Membran-Shuttle-Theorie durch eine verstärkte Internalisierung. Um diese Internalisierung zeigen zu können, wurden sowohl densitometrische Analysen der AQP2-Expression in Plasma-Membranen als auch immunhistochemische Methoden angewandt.

Zur densitometrischen Analyse der Membran-assoziierten AQP2-Kanäle ist eine saubere Abtrennung von Plasma-Membranen (PM) und vesikulären Membranen (VM) erforderlich. Mittels differentieller Zentrifugation wurden Plasma-Membran-Fraktionen erhalten, die nahezu frei von vesikulären Bestandteilen waren (vgl. Abb. 30). Als Marker dienten hierbei Na-K-ATPase (an PM assoziiert) und Rab5A (an VM assoziiert [9]).

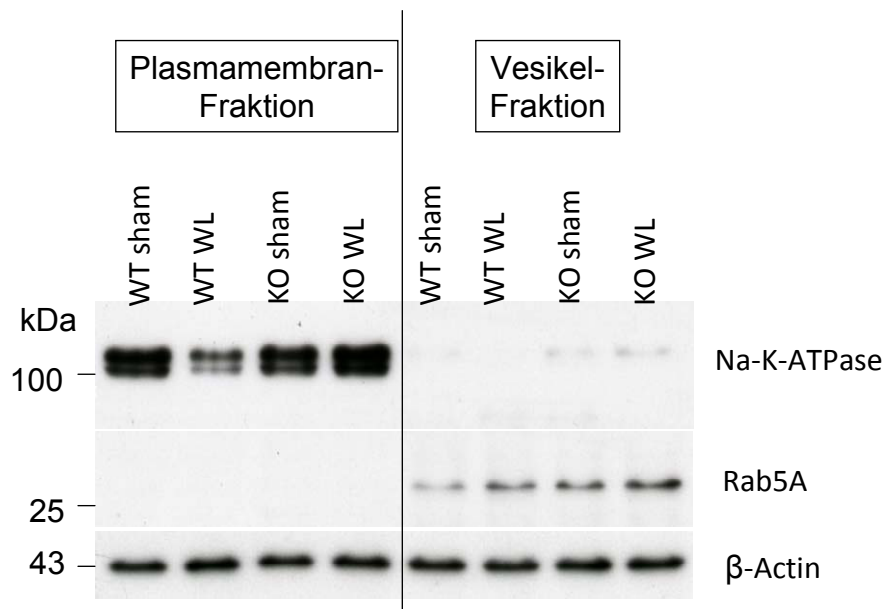


Abb. 30: Reinheitsanalyse der verwendeten Fraktionen

14%ige SDS-Gel-Analyse/Western Blot mit je 70µg Gesamtprotein aus Plasmamembran- bzw. Vesikelfraktionen. Verwendete Antikörper: Na-K-ATPase (PM-Marker), Rab5A (Vesikelmarker), β-Actin (Ladungskontrolle). Weitere Erklärungen siehe Text.

C.3.4.2.1 Qualitative und quantitative Analyse der Membranlokalisation mittels IHC und WB

Um Membran-Shuttling-Prozesse qualitativ beurteilen zu können, wurden Paraffinschnitte immunhistochemisch mit AQP2-Antikörpern (und dazugehörigem Cy2-gekoppelten Sekundär-Antikörpern) gefärbt und anschließend am konfokalen Lasermikroskop (confocal laser scanning microscopy CLSM) analysiert. Diese Mikroskopie-Form ist hier durch die scharfe Darstellung

einzelner Ebenen im Schnitt besser geeignet als die konventionelle Fluoreszenz-Mikroskopie. Die Aufnahmen erfolgten am Axiovert 200 M Konfokalmikroskop (40x/1,30 Öl-Immersions-Objektiv) und entstanden unter der freundlichen Hilfe von Johannes Hüttner (N pro Gruppe= 2-3). Abb. 31 illustriert exemplarische Aufnahmen aus der renalen innermedullären Sektion der Versuchstiere. Während im WT unter Kontrollbedingungen eine eher membran-nahe Verteilung von AQP2 beobachtet werden konnte (rote Pfeile), zeigte sich AQP2 30min nach WL über das gesamte Cytosol verteilt. Im KO hingegen sahen sich die Verteilungsmuster beider Bedingungen sehr ähnlich, es konnte in beiden Fällen eine eher membran-nahe Verteilung detektiert werden. Nachfolgend sollte diese qualitative Beobachtung ebenfalls quantitativ nachgewiesen werden. Aus diesem Grund wurden von allen Versuchsgruppen die Plasmamembranen medullärer Nieren-Fragmente mittels differentieller Zentrifugation gewonnen und densitometrisch analysiert.

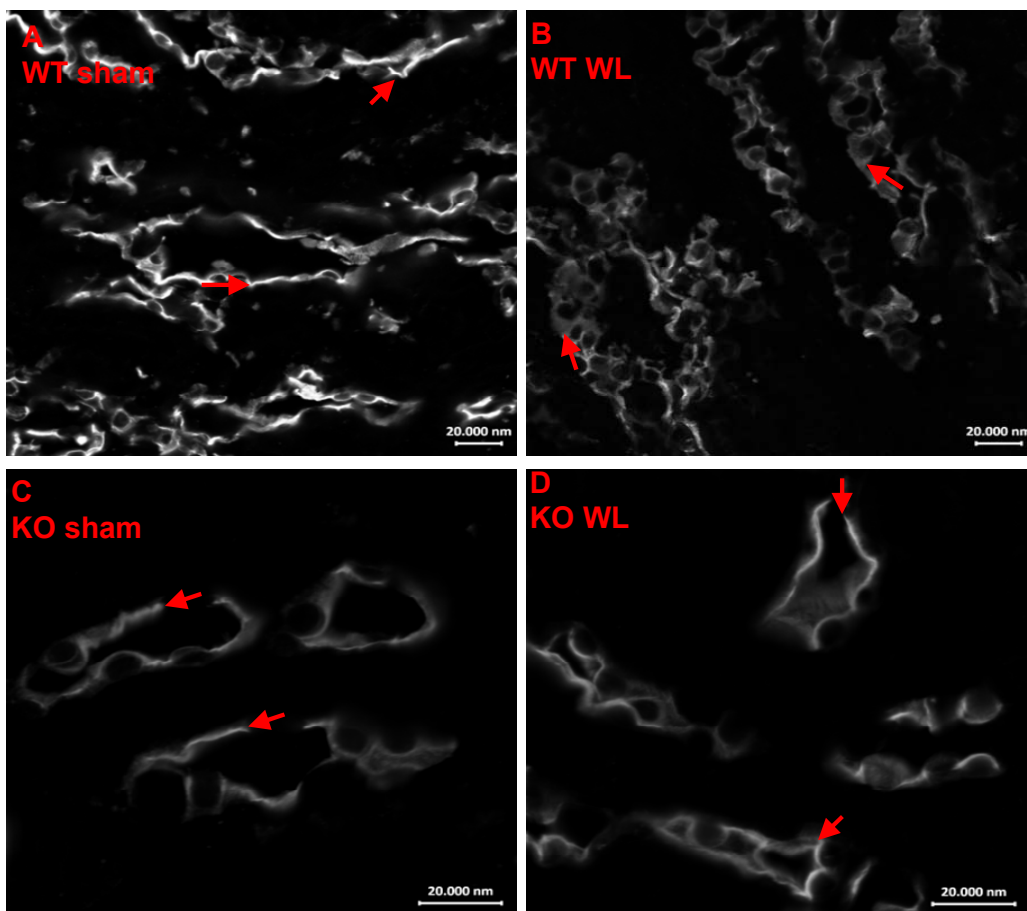


Abb. 31: Immunhistochemische Analyse der Membranverteilung von AQP2

renale, PFA-fixierte Paraffinschnitte, AQP2/Cy2-gefärbt und am CLSM konfokal mikroskopiert. Rote Pfeile deuten auf die verstärkte membranäre (A, C, D) bzw. cytosolische (B) Verteilung von AQP2 hin. Weitere Erklärungen siehe Text.

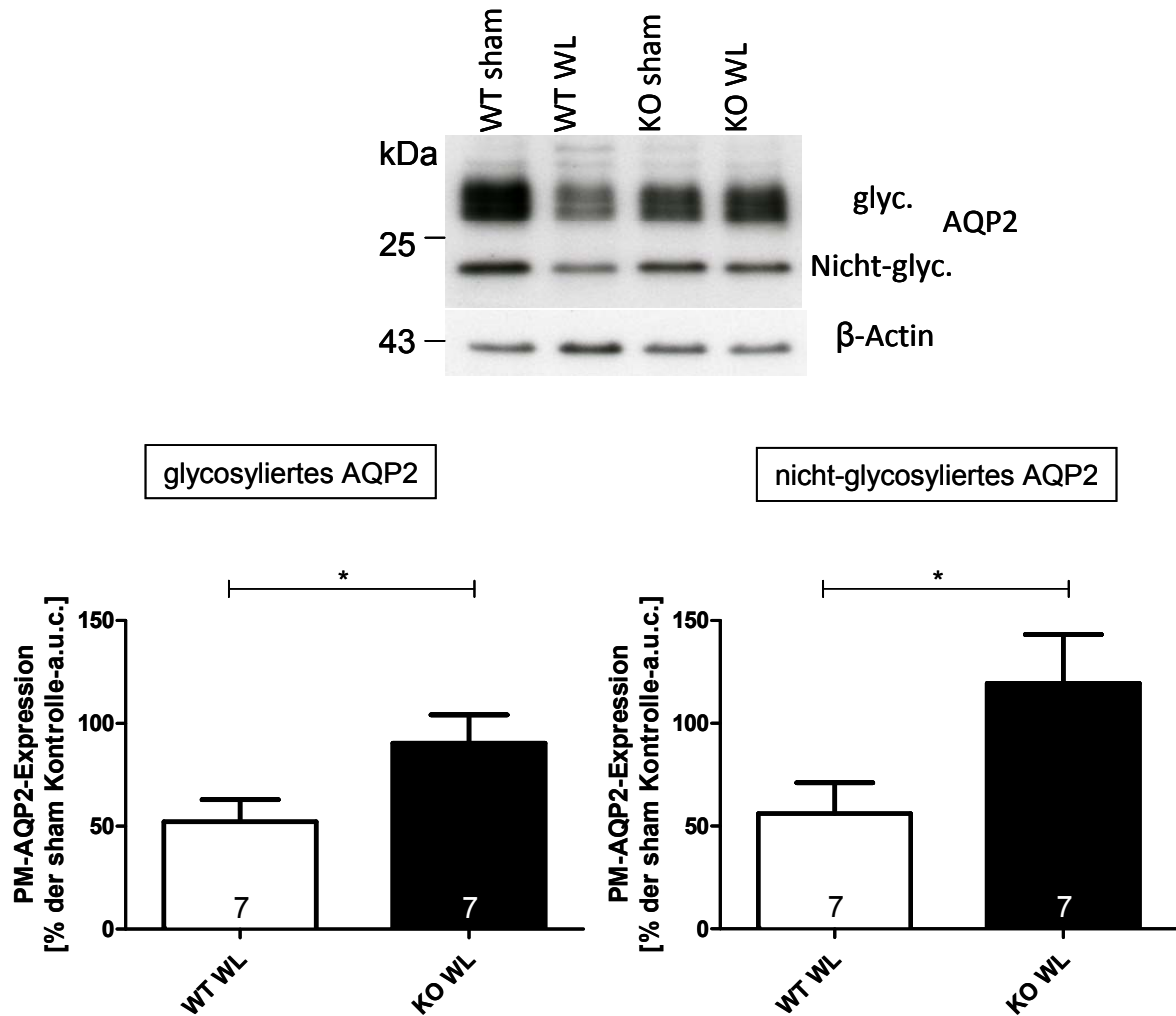


Abb. 32: Analyse der AQP2-Plasmamembranverteilung

Oben: 14%ige SDS-Gel-Analyse/Western Blot mit je 50-100µg Gesamtprotein aus medullären PM-Fraktionen (Nieren 0,5h nach WL entnommen). Verwendete Antikörper: AQP2, β-Actin (Ladungskontrolle). Unten: Densitometrische Analyse der glycosylierten (links) bzw. nicht-glycosylierten Banden (rechts). Die in ImageJ erhaltenen AQP2-Intensitäten wurden auf β-Actin normalisiert und auf die jeweilige sham-Kontrolle bezogen. Weitere Erklärungen siehe Text.

Bei der densitometrischen Bestimmung der erhaltenen glycosylierten sowie nicht-glycosylierten Banden (Abb. 32, mit exemplarischem Blot) wurde deutlich, dass die Plasmamembran-assoziierte AQP2-Expression in WT-Mäusen 30min nach WL um ca. 50% zurückgeht. Im Gegensatz dazu konnte im cGKII-KO dieser Rückgang nicht beobachtet werden, die PM-Expression lag bei 90% (Analyse der glycosylierten Banden) bzw. 120% (Analyse der nicht-glycosylierten Banden), verglichen mit sham-Kontrollen.

C.3.4.2.2 Untersuchung des Phosphorylierungs-Status von AQP2 an Ser256

Letztlich sollte noch untersucht werden, ob AQP2-Ser256 ein Phosphorylierungs-Target der cGKII darstellt. Hierzu wurden analog oben die jeweiligen Plasmamembran-Fraktionen der verschiedenen Tiergruppen mittels spezifischer Phospho-Antikörper gegen an Ser256

phosphoryliertes AQP2 analysiert und densitometrisch vermessen. Abb. 33 veranschaulicht neben dem exemplarischen Western Blot die quantitative Auswertung der Phosphorylierung an Ser256. Da sich die non-glycosylierten Banden im elektrischen Feld der SDS-PAGE auf einer sehr niedrigen Bandenhöhe nahe der Lauffront bewegen, war hier die densitometrische Auswertung nur eingeschränkt möglich. Dies spiegelt sich auch in den hohen Standardabweichungen des Mittelwerts wider. Allerdings zeigte sich bei der verlässlicheren, da weniger fehlerbehafteten Analyse der glycosylierten P-AQP2- Banden, dass die Phosphorylierung in beiden Genotypen nach WL auf ca. 70% der sham-Kontroll-Werte zurückgeht.

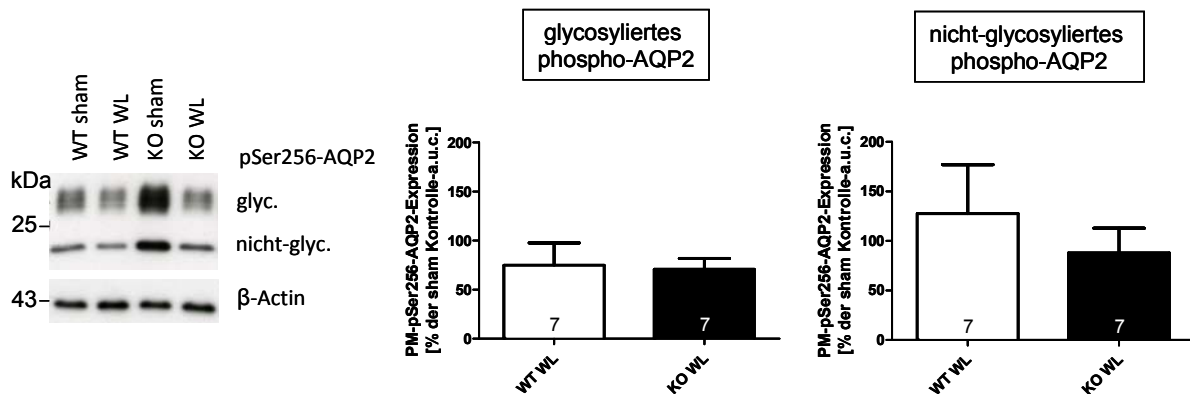


Abb. 33: Untersuchung der Ser256-Phosphorylierung PM-ständiger AQP2-Kanäle

links: 14%ige SDS-Gel-Analyse/Western Blot mit je 50-100µg Gesamtprotein aus medullären PM-Fraktionen (Nieren 0,5h nach WL entnommen). Verwendete Antikörper: P-Ser256-AQP2, β-Actin (Ladungskontrolle). Mitte und Rechts: Densitometrische Analyse der glycosylierten bzw. nicht-glycosylierten Banden. Die in ImageJ erhaltenen P-AQP2-Intensitäten wurden auf β-Actin normalisiert und auf die jeweilige sham-Kontrolle bezogen. Weitere Erklärungen siehe Text.

Neben den Plasmamembranfraktionen wurden zusätzlich die Vesikelfraktionen hinsichtlich AQP2 und P-AQP2 analysiert. Da es sich hier jedoch um relativ heterogene Fraktionen handelte, die sämtliche Zell-Vesikel-Strukturen beinhalteten, waren auch die Ergebnisse sehr heterogen, was sich in unzuverlässigen Werten mit einer hohen Standard-Abweichung des Mittelwerts äußerte. Analysiert wurden hierbei lediglich die Proteinbanden, die glycosyliertem AQP2 bzw. P-Ser-256-AQP2 entsprachen:

AQP2:	WT:	62,6% der sham-Kontrolle ± 16%; N=7
	KO:	106,0% der sham-Kontrolle ± 25%; N=6
P-Ser256-AQP2:	WT:	109,8% der sham-Kontrolle ± 36%; N=7
	KO:	102,1% der sham-Kontrolle ± 24%, N=7

D. Diskussion

D.1 Die cGKII hat keinen Einfluss auf die basale Wasser- und Elektrolytausscheidung

Um renale Grundparameter zu bestimmen, wurden WT- und cGKII-KO-Mäuse mit freiem Zugang zu Wasser und Futter in Stoffwechselkäfigen gehalten und der Urin über einen Zeitraum von 24h gesammelt, sodass die circadiane Rhythmik der Tiere berücksichtigt wurde [149]. Hierbei zeigte sich, dass cGKII-defiziente Tiere bei durchschnittlicher Salzzufuhr in der Lage waren, eine normale Nierenfunktion aufrechtzuerhalten (vgl. Tab. 8). Es konnte weder ein Unterschied der aufgenommenen Flüssigkeits- und Futtermengen noch bezüglich der ausgeschiedenen Wasser- und Elektrolytmengen detektiert werden. Auffallend war die hohe Differenz zwischen aufgenommener und ausgeschiedener Flüssigkeitsmenge, welche bei beiden Genotypen gleichermaßen auftrat. Da sich das Gewicht der Tiere vor und nach dem Messzeitraum nicht grundlegend änderte, kann eine Wasseransammlung im Körper der Mäuse ausgeschlossen werden. Neben der renalen kommen weiterhin die intestinale (der Faeces der Mäuse war allerdings von normaler Konsistenz) sowie die transdermale Ausscheidung von überschüssiger Flüssigkeit in Betracht. Vermutlich kann dieser starke Unterschied jedoch systemisch mit einer erhöhten Verdunstung des Urins in den großflächigen Sammeltrichtern der verwendeten Stoffwechsel-Käfige begründet werden. Es wurden verschiedene Möglichkeiten ausgetestet, die Verdunstung möglichst gering zu halten, z.B. wurden die Trichter silikonisiert, wodurch jedoch nur eine geringfügige Verbesserung auftrat. Da Silikon-Verunreinigungen im Urin möglicherweise einen Störfaktor für nachfolgende Messungen dargestellt hätten, wurde letztlich auf dieses Hilfsmittel verzichtet und die Verdunstung in Kauf genommen.

D.1.1 Die Nierenfunktion ist unter Renin-stimulatorischen und – inhibitorischen Bedingungen nicht beeinträchtigt

Die Aktivität des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS) kann durch Salzaufnahme im Rahmen des tubuloglomerulären Feedbacks positiv und negativ beeinflusst werden. So führt eine Niedrigsalz-Diät zu einer Aktivierung des RAAS, während Hochsalz-Diäten das RAAS hemmen [87]. Da es Hinweise dafür gibt, dass die cGKII die Renin-Freisetzung moduliert [248], wurde in dieser Arbeit die Wasser- und Elektrolyt-Ausscheidung von WT- und cGKII-KO-Tieren nach einwöchiger Niedrigsalz- bzw. Hochsalzdiät bestimmt (siehe Tab. 8). Hierbei ergaben sich unter beiden Bedingungen keine signifikanten Unterschiede, so dass der Einfluss der cGKII auf die Renin-Freisetzung und weiterführende physiologische Konsequenzen *in vivo* wohl eher von untergeordneter Bedeutung ist bzw. eventuell durch andere Mechanismen kompensiert wird. Vor Kurzem wurde gezeigt, dass ein durch die sGC generierter intrazellulärer cGMP-Pool die Reninzell-Rekrutierung in präglomerulären Gefäßen beeinflusst [159]; des Weiteren konnte kürzlich eine Co-Lokalisierung der cGKI α mit Renin in reninbildenden Zellen nachgewiesen

werden [202]. Es ist nicht bekannt, ob die Deletion der cGKII die Expression der cGKI-Isoformen beeinträchtigt, so dass möglicherweise die erhöhte Renin-Expression in cGKII-KO-Tieren durch eine cGKI-abhängige Kompensation ausgeglichen wird.

D.1.2 cGKII-KO-Tiere zeigen eine veränderte Kreatinin-Ausscheidung

Kreatinin wird als endogenes Stoffwechselprodukt häufig zur Bestimmung der glomerulären Filtrationsrate (GFR) herangezogen. Die Eignung dieses Markers ist hierbei jedoch zweifelhaft, da zusätzlich zum glomerulär filtrierten Anteil nochmals ca. 15% des letztlich ausgeschiedenen Kreatinins tubulär sezerniert werden; eine ungleich höhere Sezernierung (35-50%) wurde in Mäusen berichtet [58], [111]. Nichtsdestotrotz wurde im Rahmen dieser Arbeit die Kreatinin-Clearance für eine erste Abschätzung der GFR bestimmt. Dabei zeigte sich, dass die ausgeschiedene Kreatinin-Menge im cGKII-KO, verglichen mit dem WT, unter Normal-Salz-Bedingungen signifikant, unter allen weiteren untersuchten Bedingungen tendenziell erniedrigt war. Im Vergleich dazu konnten bei den Serum-Kreatinin-Spiegeln keinerlei Unterschiede detektiert werden (siehe Tab. 8). Da dies ein Hinweis dafür ist, dass die Kreatinin-Ausscheidung durch die cGKII beeinflusst werden könnte, kommt die Bestimmung der Kreatinin-Clearance zur Abschätzung der GFR nicht in Frage. Diese müsste mit anderen Methoden, beispielsweise der Messung der Inulin- bzw. Sinistrin-Clearance abgeklärt werden. Sollten sich hierbei keine Unterschiede zwischen den Genotypen ergeben, wäre die verminderte Kreatinin-Ausscheidung auf Störungen in dessen Stoffwechsel zurückzuführen. Kreatinin entsteht im Skelettmuskel mit einer relativ konstanten Rate als Abbauprodukt des Kreatins, wobei sich die Serumkonzentration der Muskelmasse annähernd proportional verhält. Die Muskelmasse in cGKII-KO-Tieren wurde bislang nicht bestimmt, so dass bislang keine Rückschlüsse auf die Syntheserate von Kreatinin gezogen werden können. Da im Rahmen dieser Arbeit entgegen vorangegangener Publikationen [174] gezeigt wurde, dass diese Tiere ein geringeres Organgewicht (zumindest in Bezug auf die Niere, vgl. Abb. 15) aufweisen, wäre es denkbar, dass auch die Muskelmasse und demzufolge die Kreatinin-Produktion erniedrigt ist. Die Gesamt-Serumkonzentration von Kreatinin setzt sich zusammen aus der synthetisierten Menge abzüglich des renal filtrierten und sezernierten Anteils. Möglicherweise könnte die nachgewiesene verminderte Kreatinin-Ausscheidung bei gleichbleibenden Serumspiegeln durch eine reduzierte Syntheserate und gleichzeitig eine verminderte renale Exkretion bedingt werden. Die Sekretion von Kreatinin findet im proximalen Tubulus unter Beteiligung von OCT2 (organic cation transporter 2) von MATE1 und MATE2-K (multidrug and toxin extrusion) statt [232], [236]. Hierbei wird Kreatinin auf basolateraler Seite durch den Uniporter OCT2 in die Zelle geschleust und verlässt diese auf der apikalen Seite im Austausch gegen Protonen durch die beiden MATE-Isoformen. Über die Regulation dieser Kationen-Transporter ist bislang wenig bekannt. Vor einigen Jahren konnte in stabil transfizierten HEK293-Zellen eine Stimulation des OCT2-vermittelten Kationen-Transports durch diverse Kinasen, darunter die PKA oder auch die MAP-Kinase gezeigt werden [256]. Wie bereits eingangs erwähnt, wurde auch die Expression der cGKII auf mRNA-Ebene im

Bürstensaumepithel des proximalen Tubulus bereits belegt [74]. Die post-translationale Regulation der Kreatinin-Transporter durch cGKII-abhängige Phosphorylierung könnte deshalb eine mögliche Erklärung für die erniedrigte Kreatinin-Ausscheidung darstellen. Weiterhin konnte in Zellkultur ein inhibitorischer Einfluss von cGMP auf den OCT2-vermittelten Kationentransport demonstriert werden [203]. Im Gegensatz dazu scheinen die erniedrigten Kreatinin-Konzentrationen *in vivo* eher auf eine stimulatorische Rolle des cGMP/cGK-Signalwegs hinzudeuten, so dass weitere Untersuchungen zur genaueren Analyse der zugrunde liegenden Transduktionsmechanismen unumgänglich sind.

D.2 Die cGKII ist nicht an der Urin-Aufkonzentrierung beteiligt

Nachdem zunächst mithilfe von Hochsalz-Diäten die längerfristige Regulation der Urin-Aufkonzentrierung analysiert wurde, bei welcher die Mäuse die Möglichkeit hatten, die stark erhöhten Natrium-Konzentrationen durch eine gesteigerte Flüssigkeitsaufnahme zumindest teilweise zu kompensieren, wurde mit Durstversuchen sowie mit der oralen Applikation einer hypertonen Lösung die kurzfristige Urin-Aufkonzentrierung untersucht. Die Dehydratation mittels Durstversuchen zielte hierbei in erster Linie darauf ab, durch die graduell einsetzende Hyperosmolarität eine gesteigerte Vasopressin-Freisetzung und damit einen gesteigerten AQP2-Einbau in den apikalen Plasmamembranen der Sammelrohrzellen zu bewirken, während die Applikation einer hypertonen Lösung zu einem akuten Anstieg derselben sowie zu Hypernatriämie führt (Osmoregulation). Die derart induzierte Urin-Aufkonzentrierung erfolgte hierbei in cGKII-KO-Mäusen analog zum WT, auch bezüglich der AQP2-Verteilung konnten keine Unterschiede detektiert werden (vgl. Abb. 16, Abb. 17, Abb. 20). Somit scheinen die Vasopressin-Freisetzung und die darauffolgende Regulation von AQP2 im Sammelrohr unabhängig von der cGKII zu verlaufen. Interessanterweise konnte 2013 in einer Studie gezeigt werden, dass die Gabe von Glucocorticoiden im Durstversuch zu einer normalen Urin-Aufkonzentrierung trotz gleichbleibender Vasopressin-Serum-Spiegel führt. Hierbei wurden erhöhte ANP-Konzentrationen im Plasma beobachtet, so dass anscheinend unter bestimmten physiologischen Bedingungen Vasopressin-unabhängige Mechanismen zum Tragen kommen, welche eine Aktivierung des ANP-Systems und möglicherweise eine cGKII-abhängige Regulation von AQP2 bewirken [235].

Neben der Flüssigkeitsausscheidung wirkt sich eine Hyperosmolarität auch auf die Natriuresis aus. Die Natriumausscheidung wird nach Applikation einer hypertonen Lösung wesentlich stärker beeinflusst, als dass dies der Fall ist, wenn gleiche Natrium-Mengen in einer isotonen Lösung verabreicht werden [6]. Die zugrunde liegenden Mechanismen dieser ‚osmo-vermittelten Natriuresis‘ sind bislang nur unzureichend verstanden. Erste Untersuchungen am Menschen weisen lediglich darauf hin, dass Blutdruck und GFR durch die Hyperosmolarität unbeeinflusst sind und die Komponenten des RAAS in gleichem Maß wie bei isotoner Volumenexpansion abnehmen, während sich der Serum-ANP-Spiegel nicht ändert [6]. Interessanterweise führt die Infusion einer hypertonen NaCl-Lösung in bestimmten Bereichen des Ratten-Gehirns neben der

Natriurese auch zu einem Anstieg der cGMP-Exkretion [24], so dass cGMP-abhängige Regulationsmechanismen nicht ausgeschlossen werden können. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte in Hinblick auf die hypertone Volumenexpansion ebenfalls eine höchst signifikant gesteigerte Natriumausscheidung nach Applikation einer 4%-igen NaCl-Lösung ermittelt werden (vgl. Abb. 20). Dieser Anstieg wurde sowohl im WT als auch im cGKII-KO beobachtet, so dass diese kurzfristige Regulation augenscheinlich keine Beteiligung der cGKII umfasst. Neuere Studien lassen einen Zusammenhang zwischen der Calciurese und der osmo-vermittelten Natriurese erkennen und weisen auf eine mögliche Beteiligung von V_{1a} -Rezeptoren hin [99]. Genauere mechanistische Analysen stehen hierbei jedoch noch aus.

Da natriuretischen Peptiden eine wichtige Funktion bei der Volumenregulation zugeschrieben wird, wurde weiterhin die Diurese und Natriurese nach Applikation einer isotonen Lösung untersucht (Abb. 19). Hierbei konnte in beiden Genotypen eine signifikante Steigerung der Diurese und Natriurese beobachtet werden, letztere erschien im cGKII-KO, verglichen mit dem WT, tendenziell leicht erniedrigt, der Unterschied war allerdings statistisch nicht signifikant. Möglicherweise übt die cGKII unter diesen Bedingungen einen geringfügig hemmenden Effekt auf den epithelialen Natriumkanal aus, wodurch im cGKII-KO tendenziell eine gesteigerte Natrium-Rückresorption gegeben ist (siehe unten). Bezüglich der Diurese spielt die cGKII bei der Volumenregulation augenscheinlich keine Rolle oder deren Defizienz wird durch andere Mechanismen kompensiert.

D.3 Die Beteiligung des cGMP/cGKII-Signalsystems bei der forcierten Urin-Verdünnung

Nachdem die Analyse der Rolle der cGKII bei der Urin-Aufkonzentrierung ohne Befund blieb, wurde nachfolgend mittels Applikation einer hypotonen Lösung (Water Load, WL) die Urin-Verdünnung untersucht. Hierbei zeigte sich, dass die forcierte Diurese im cGKII-KO-Tier, verglichen mit dem WT, signifikant schwächer ausgeprägt war und Störungen in der Elektrolytausscheidung vorlagen (vgl. Abb. 23, Abb. 24, Tab. 10, Tab. 11). Diese Unterschiede bei der Diurese waren nicht auf einen erhöhten Blutdruck zurückzuführen, da dieser bei allen untersuchten Tiergruppen gleich war (vgl. Abb. 25). Hierzu muss bemerkt werden, dass die erhaltenen Werte, verglichen mit publizierten Daten, allesamt etwas niedrig erscheinen. Die Methode des Tail-Cuffs zur Bestimmung des Blutdrucks ist eine relativ fehleranfällige Methode; so führt eine Reihe von zufälligen und systemischen Fehlern unter Umständen zu ungenauen Ergebnissen. Vorheriges Training der Mäuse, Vortemperierung des Messgerätes/der Tiere sowie mehrfache Messungen helfen hierbei, v.a. zufällige Fehlerquellen zu beseitigen. Die geringe Standardabweichung des Mittelwerts (SEM) bei den hier erhaltenen Daten deutet darauf hin, dass es sich eher um systematische Fehler handelte, beispielsweise könnte die Signalübertragung am Gerät nicht optimal gewährleistet gewesen sein. Diese Art von Fehler betraf alle Tiergruppen gleichermaßen, so dass sämtliche erhaltenen Werte im Vergleich zu Literaturangaben erniedrigt waren und die Vergleichbarkeit der Gruppen untereinander gegeben

war. Auch Unterschiede in der GFR von WT- und cGKII-KO-Tieren nach WL kämen als Ursache für die beobachteten Unterschiede bei der Diurese und der Elektrolytausscheidung in Betracht. Aus diesem Grund wurde die Kreatinin-Ausscheidung im 2h-Urin der Tiergruppen analysiert (vgl. Tab. 11). Analog zu den vorangegangenen Versuchen wurde auch hier eine leichte Verminderung der Kreatinin-Spiegel detektiert, so dass eine geringere GFR nicht völlig ausgeschlossen werden konnte. Allerdings waren die Unterschiede in der Kreatinin-Ausscheidung nicht statistisch signifikant und fielen nicht stärker aus als unter basalen Bedingungen, so dass hier vermutlich auch eher Defekte in der Kreatinin-Sekretion zugrunde lagen.

D.3.1 Die hypotone Volumenexpansion führt zur Steigerung der renalen cGMP-Synthese

Nachdem Unterschiede im Blutdruck bzw. der GFR nicht als Ursache für die beobachteten Defizite in der Urin-Verdünnung der cGKII-KO-Tiere in Betracht kamen, wurde nachfolgend überprüft, ob die Verabreichung einer hypotonen Lösung zu Änderungen der cGMP-Synthese führt. Hierbei zeigte sich, dass sowohl die cGMP-Konzentration in renalem Gewebe als auch die cGMP-Exkretion bei WT und KO nach WL gleichermaßen tendenziell erhöht waren (vgl. Abb. 26). Dieser Anstieg war in keinem Genotyp statistisch signifikant, wofür mehrere Erklärungen möglich sind. Zunächst wurde hier nur eine relativ geringe Anzahl an Proben untersucht. Bei der alleinigen statistischen Analyse der Urin-KO-Daten mithilfe des t-Tests (hier lag die Anzahl der WL-Proben mit N=8 deutlich höher als der Durchschnitt) ergab sich ein p-Wert von 0,059, was ein deutlicher Hinweis darauf ist, dass mit einer Anzahlerhöhung auch im ANOVA eine statistische Signifikanz erreicht werden würde. Der Anstieg der cGMP-Konzentration in renalem Gewebe fällt hingegen relativ gering aus. Aufgrund der Vielzahl an unterschiedlichen Zelltypen in der Niere würde eine vorhergehende Mikrodisektion von Sammelrohren eine spezifischere Analyse ermöglichen und evtl. deutlichere Unterschiede offenbaren. Da die cGMP-Spiegel sowohl im WT als auch im KO simultan anstiegen, konnte davon ausgegangen werden, dass die Defekte in der Urin-Verdünnung im cGKII-KO downstream der cGMP-Synthese zu finden waren. Welche upstream-Regulatoren diese cGMP-Erhöhung bewirkten, bleibt weiterhin strittig, da diese nicht näher charakterisiert wurden. Lange Zeit wurden die ‚klassischen natriuretischen Peptide‘ ANP und BNP als die renalen Haupteffektor-Moleküle bei der Induktion einer Diurese bzw. Natriurese angesehen. Da die Synthese und Sekretion dieser Peptide durch erhöhten atrialen bzw. ventrikulären Druck und damit einhergehender gesteigerter Wandspannung erfolgt [215], lag die Vermutung nahe, dass ANP und BNP neben cardialen und hämodynamischen Auswirkungen auch direkte Effekte auf das renale Tubulussystem haben und damit eine unmittelbare cardio-renale Achse zur Verminderung eines cardio-vaskulären Überdrucks bilden. Der Einfluss von ANP auf die cGMP-Produktion in den unterschiedlichen Nephron-Segmenten wurde bereits vor fast 30 Jahren analysiert, hierbei konnte v.a. im Glomerulum sowie im innermedullären Sammelrohr unter physiologischen ANP-Konzentrationen ein Effekt beobachtet

werden [164]. Zahlreiche Studien demonstrierten nachfolgend einen Einfluss von ANP auf die Wasser- und Ionenrückresorption im Sammelrohr, jedoch wurden diese Studien meist in Zellkultur bzw. in Sammelrohr-Mikrodissektionen durchgeführt und ANP exogen zugegeben. Nach einer Erhöhung des Serumspiegels von BNP wurde ebenfalls eine verstärkte Diurese und Natriurese beschrieben; die Hemmung der Natrium-Rückresorption findet hier v.a. in distalen Nephron-Segmenten sowie möglicherweise auch im proximalen Tubulus statt [107], [166], [225], [245]. Die verstärkte Natriurese könnte also mit einer niedrigeren osmotischen Triebkraft für die Rückresorption von Wasser einhergehen und damit nachfolgend eine gesteigerte Diurese bedingen. Allerdings wird ein erhöhter Serumspiegel von ANP und BNP v.a. im Rahmen pathophysiologischer Zustände wie z.B. der Herzinsuffizienz verzeichnet; inwieweit ANP und BNP bei der hier beobachteten WL-induzierten Diurese zu einer Steigerung der cGMP-Spiegel geführt haben, bleibt fraglich.

Das dritte ‚klassische‘ natriuretische Peptid, CNP, ist, zumindest unter physiologischen Bedingungen, vermutlich nicht an der Regulation des Flüssigkeitshaushalts beteiligt. NPR-B, der Rezeptor für CNP, wurde im Sammelrohr lediglich in Schaltzellen, nicht jedoch in Hauptzellen gefunden, was eine direkte Beeinflussung der Wasser-Rückresorption durch einen CNP/NPR-B-generierten cGMP-Pool unwahrscheinlich macht [185].

Dem im distalen Tubulus sezernierten Peptid Urodilatin wird, verglichen mit ANP, mehr Bedeutung bei der Regulation von Diurese und Natriurese beigemessen [65]. Das intrarenale parakrine System unterstützt hierbei systemische Wirkungen der weiteren natriuretischen Peptide und wirkt als essenzieller physiologischer Modulator im renalen Sammelrohr. Im Gegensatz zu ANP weist Urodilatin eine höhere Stabilität bei der enzymatischen Degradation durch neutrale Endoproteasen (auch Endopeptidasen, NEP) auf, so dass bereits geringe Mengen sezernierten Peptids zu einer Aktivierung von NPR-A und damit zur intrazellulären cGMP-Synthese in Hauptzellen des Sammelrohrs führen [73]. Mehrere Studien zeigen eine Korrelation zwischen der Urodilatin-Ausscheidung und der Natrium-Homöostase im Körper auf, so führte u.a. im Menschen eine länger andauernde Natrium-Diät zu einem signifikanten Anstieg der Urodilatin-Exkretion sowie der Natriurese [150]. Inwieweit eine hypotone Flüssigkeitszunahme zu einem Anstieg der Urodilatin-Sezernierung in das renale Tubulussystem führt, ist bislang unklar. Eine Analyse der Urodilatin-Konzentration im Urin von Volumen-expandierten Mäusen könnte die Beteiligung dieses Peptids an Prozessen, die eine Urin-Verdünnung erfordern, zeigen.

Auch eine Beteiligung von Guanylin bzw. Uroguanylin kann nicht ausgeschlossen werden. Bei dem Hauptrezeptor für diese Peptide handelt es sich um NPR-C; dieser Rezeptor besitzt keine Guanylat-Cyclase-Aktivität. Hierdurch wird die cGMP-Synthese höchstens indirekt beeinflusst, wenngleich renale Effekte, wie eine ausgeprägte Natriurese und Diurese nach einer GN bzw. UGN-Administration, auch in NPR-C-KO-Mäusen beobachtet wurden und somit weitere Signalwege für Guanylin-Peptide existieren müssen [37], [217]. Durch die Bindung von Guanylin-Peptiden an NPR-C-Rezeptoren wird deren Kapazität zur Bindung und nachfolgendem Abbau anderer natriuretischer Peptide vermindert, so dass möglicherweise hierdurch lokal die

Konzentration der NPs erhöht wird, was zu einer verstärkten Aktivierung von NPR-A führen würde. Somit hätten Guanylin-Peptide eventuell einen synergistischen Effekt auf die cGMP-Produktion in Sammelrohr-Zellen. Guanylin und Uroguanylin wird eine Rolle bei der Regulation der Salz- und Wasser- Homöostase im GIT und der Niere zugeschrieben. Nach erhöhter Salzzufuhr werden diese Peptide in das Darm-Lumen bzw. in das Blut sezerniert und inhibieren sowohl intestinal als auch renal u.a. die Natrium-Rückresorption [10], [67], [216]. Neue Untersuchungen deuten jedoch darauf hin, dass die Existenz solch einer gastrointestinal-renalen Signalachse zumindest im Menschen in Zweifel gezogen werden muss und die renale Wirkung von Guanylin-Peptiden wohl weniger hormonell, sondern eher auf autokrine und parakrine Weise erfolgt. Bei der Analyse von Probanden-Seren nach oraler bzw. intravenöser Natrium-Belastung wurde keine Korrelation zwischen der Konzentration von (Uro-)Guanylin-Vorstufen und der Natrium-Ausscheidung gefunden, tatsächlich stieg die Konzentration der Peptide nicht einmal an [177]. Da in der vorliegenden Arbeit keine cGKI-abhängige Beeinflussung der Natriurese im Rahmen von Hochsalz-Diäten beobachtet werden konnte, sondern im Gegensatz dazu vielmehr die Diurese und Natriurese in Folge einer hypotonen Volumenbelastung beeinträchtigt war, wurde die Steigerung der cGMP-Spiegel wohl weniger von Guanylin-Peptiden verursacht. Vermutlich wurde diese eher durch ‚klassische natriuretische Peptide‘ bzw. Urodilatin ausgelöst.

D.3.2 Die hypotone Volumenexpansion hat keine Auswirkung auf die Vasopressin-Exkretion

Nachdem die Regulation der Diurese im Sammelrohr vor allem von Vasopressin (AVP) abhängt, könnte die veränderte Wasserausscheidung im cGKI-KO auch durch unterschiedliche AVP-Spiegel begründet werden. Die Analyse der Konzentration im Urin der unterschiedlichen Tiergruppen zeigte hierbei, dass sich die Vasopressin-Ausscheidung zwar weder zwischen WT und KO unterschied, allerdings auch in keinem Genotyp ein Abfall der Konzentration nach Water Load zu beobachten war (vgl. Abb. 26). Dies war insofern unerwartet, da im Zuge der Osmoregulation bei einer hypotonen Volumenbelastung die AVP-Freisetzung aus dem Hypophysenhinterlappen unterdrückt werden sollte und nachfolgend auch die Konzentration des Hormons im Urin abnehmen sollte. Interessanterweise kamen auch andere Arbeitsgruppen zu einem ähnlichen Ergebnis [100]. Eine nachweisbare Reduktion der Vasopressin-Exkretion könnte eventuell erst durch Applikation eines größeren Volumens erreicht werden, da die gewählten Versuchsbedingungen (3% d. Körpergewichts) vermutlich die Plasma-Osmolarität nur geringfügig ändern. Weiterhin würde eine Untersuchung der AVP-Serum-Konzentrationen die tatsächliche Sekretion wohl deutlicher reflektieren. Leider sind mit den bislang erhältlichen kommerziellen Kits keine zuverlässigen AVP-Messungen in murinem Serum möglich; das benötigte Proben-Volumen übersteigt die Menge an Serum, die pro Maus gewonnen werden kann. Aus diesem Grund müsste man mehrere Proben poolen, wodurch die tatsächlichen Konzentrationen im einzelnen Tier wiederum unklar bleiben würden. Wie bereits eingangs erwähnt, hat ANP einen Einfluss auf die Vasopressin-Freisetzung in der Hypophyse [2], [194], [257]. Es ist nicht bekannt, ob diese

Beeinflussung cGKII-abhängig vermittelt wird; weiterhin wurde nicht untersucht, ob die Volumenbelastung überhaupt einen Anstieg der ANP-Konzentration verursacht hat. Somit kann eine unterschiedliche Vasopressin-Konzentration im Serum als Grund für die signifikant verminderte Diurese im cGKII-KO nicht vollständig ausgeschlossen werden. Unter der Prämisse, dass Serum- und Urin-Spiegel eine hohe Korrelation aufweisen [59], erscheint es jedoch wahrscheinlicher, dass die erhöhte Diurese im WT eher durch eine direkte Einwirkung der cGKII auf die Wasserkanäle im Sammelrohr ausgelöst wird. Dieser Aspekt wird im Weiteren diskutiert.

D.3.3 Das Fehlen der cGKII führt bei forcierter Diurese zu einer veränderten Membranexpression von AQP2

Für die Wasserrückresorption im Sammelrohr sind insbesondere die AQP2-Wasserkanäle verantwortlich. Daher wurde die AQP2-Verteilung anhand von Plasma-Membran-Präparationen aus medullärem Nieren-Gewebe densitometrisch sowie immunhistochemisch am Konfokalmikroskop analysiert (Abb. 31, Abb. 32). Bei der quantitativen Auswertung wurde deutlich, dass infolge der hypotonen Volumenexpansion die Plasmamembran-Expression von AQP2 im WT um 50% reduziert wurde. Im Gegensatz dazu konnte in cGKII-KO-Mäusen nahezu dieselbe Membranverteilung wie unter sham-Bedingungen beobachtet werden, wodurch die verminderte Diurese dieser Tiere nach WL, verglichen mit WT-Tieren, erklärt werden kann. Hierbei ist unklar, ob die signifikant erhöhte Plasma-Membran-Expression im KO durch eine verminderte Endozytose der bereits in der Membran lokalisierten Kanäle, durch einen gesteigerten Einbau oder eine Kombination aus beidem entsteht. In Zellkultur konnte gezeigt werden, dass nach einem hypotonen Schock der Anstieg der intrazellulären AQP2-Expression hauptsächlich durch eine Relokalisierung von der Plasmamembran in das subapikale Cytoplasma stattfindet, weshalb die beobachteten Effekte im cGKII-KO *in vivo* vermutlich auch eher auf eine Retention der Wasserkanäle in der Membran und damit eine geringere Endozytose zurückzuführen sind [230]. Weiterhin konnte in dieser Studie gezeigt werden, dass die Behandlung der Zellen mit hypotonem Medium die Menge an AQP2-Gesamtprotein nicht verändert hat, so dass also keine signifikante AQP2-Proteindegradation stattfindet. Schließlich wurde hier auch eine signifikante Abnahme der Ser256-Phosphorylierung nach hypotonem Schock demonstriert [230].

Phosphorylierung von AQP2

Eine PKA-induzierte AQP2-Phosphorylierung an Ser256 führt zu einer gesteigerten AQP2-Membran-Akkumulation in der Membran (reviewed in [158]). Die nachfolgende mechanistische Analyse im Rahmen der vorliegenden Arbeit machte deutlich, dass die Membran-Retention von AQP2 im cGKII-KO nicht durch eine Phosphorylierung an Ser256 bewirkt wird, da diese sowohl im WT als auch im KO bezogen auf sham-Kontrollen nach WL auf 70% zurückgeht (vgl. Abb. 33). Augenscheinlich ist diese Phosphorylierungsstelle, zumindest unter den gewählten Versuchsbedingungen, keine Zielstruktur der cGKII. Ser256 wird als Haupt-Phosphorylierungs-

Stelle der PKA angesehen; die Phosphorylierung findet dann statt, wenn eine Urin-Aufkonzentrierung, nicht jedoch eine Urin-Verdünnung erforderlich ist. Neben Ser256 wurden, wie einleitend erwähnt, drei weitere Phosphorylierungsstellen im carboxyterminalen Teil von AQP2 identifiziert, Ser261, Ser264 und Ser269 [95], [97]. *In vitro* konnte anhand von primären IMCD- sowie mpkCCD-Zellen gezeigt werden, dass die Phosphorylierung an Ser256 bereits basal vorhanden ist und nach dDAVP-Inkubation nicht weiter zunimmt; im Gegensatz dazu stieg die Phosphorylierung an Ser269 hoch-signifikant an [260]. Für die Phosphorylierung an Ser269 scheint die vorherige PKA-vermittelte Phosphorylierung an Ser256 allerdings nötig zu sein, durch die zusätzliche Modifizierung des Wasserkanals wird eine gesteigerte Membran-Retention bewirkt, so dass diese Phosphorylierungsstelle wohl v.a. bei der Urin-Aufkonzentrierung eine wichtige Rolle spielt [95]. Im Gegensatz dazu scheint sich die Phosphorylierung der anderen beiden Serin-Reste weniger auf eine Membran-Retention als vielmehr auf eine verstärkte Internalisierung auszuwirken. Ser264 wurde in Zellkultur nach dDAVP-Inkubation kaum phosphoryliert [260], was darauf hindeuten könnte, dass diese Aminosäure womöglich eher in Situationen, die eine Urin-Verdünnung erfordern, modifiziert wird. In der Tat konnte an Ser264 phosphoryliertes AQP2 nur zu einem geringen Teil in der Plasmamembran, dafür hauptsächlich in subapikalen Vesikeln (kolokalisiert mit Markern für Clathrin-assoziierte Vesikel) sowie in frühen Endosomen nachgewiesen werden [64]. Auch die Phosphorylierung von Ser261 scheint der von Ser256 entgegenzuwirken. In frisch isolierten IMCD-Zellen wurde gezeigt, dass Ser261 nach Inkubation mit Vasopressin dephosphoryliert wird, diese Daten wurden auch *in vivo* bestätigt [96]. Weiterhin ist pSer261-AQP2 hauptsächlich post-endozytotisch in intrazellulären Vesikeln lokalisiert und liegt bereits ubiquitiniert vor, so dass diese Modifizierung möglicherweise eine Rolle bei der Stabilisierung von intrazellulärem AQP2 innehat [231]. Somit könnten Ser261 und Ser264 mögliche Target-Strukturen der cGKII darstellen, eine Untersuchung der Phosphorylierung dieser Aminosäuren nach hypotoner Volumenexpansion wäre ein erster Schritt bei der Analyse der intrazellulären Mechanismen, die im cGKII-KO der gesteigerten Membran-Expression von AQP2 zugrunde liegen.

Regulation der Exo- und/oder Endozytose

Die Membran-Expression von AQP2 wird durch ein Gleichgewicht zwischen Endo- und Exozytose bestimmt [122]. Hierbei bildet die Phosphorylierung von AQP2 möglicherweise die Grundlage für die Interaktion des Kanals mit Proteinen, die bei diesen Prozessen eine Rolle spielen [264]. Die Inkubation von AQP2-exprimierenden Zellen mit Vasopressin inhibiert die Clathrin-vermittelte Endozytose, u.a. indem die Phosphorylierung an Ser256 eine direkte Interaktion mit Hitzeschock-Proteinen (hsp70) verhindert, welche zentrale Regulatoren der Endozytose darstellen [29], [142]. Mittels Massenspektrometrie wurde eine ganze Reihe weiterer Bindungspartner von phosphoryliertem AQP2 identifiziert, die Bestandteil von exo- und endozytotischen Prozessen sind [153], [264]. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte keine direkte Interaktion zwischen der cGKII und AQP2 nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt),

weshalb weiterhin unklar bleibt, ob die Kinase AQP2 direkt phosphoryliert und damit die Bindung des Wasserkanals an weitere Proteine vermittelt. Somit wäre neben der Phosphorylierung von AQP2 durch die cGKII auch eine direkte Beeinflussung von Proteinen des Cytoskeletts denkbar, die zu einer Internalisierung der Wasserkanäle führen, ohne dass AQP2 direkt modifiziert wird. Beispielsweise wurde in Microglia-Zellen eine ANP- und cGMP-abhängige Reorganisation des Actin-Cytoskeletts (F-Aktin) gezeigt, die durch die Verwendung eines PKG-Inhibitors verhindert werden konnte [27]. Neben anderen spielt auch die RhoA-abhängige Signaltransduktion bei dieser Reorganisation eine Rolle. Durch Hemmung der Rho-Aktivität wird die Depolymerisation von F-Aktin erleichtert, wodurch die Exozytose AQP2-haltiger Vesikel vorangetrieben wird [182]. Die Vasopressin/cAMP-induzierte AQP2-Translokation geht einher mit einer PKA-abhängigen Phosphorylierung von RhoA, wodurch dessen Aktivität reduziert wird [229]. Für die cGK-Isoformen wurden sowohl hemmende als auch aktivierende Effekte auf RhoA beschrieben, u.a. konnte ein stimulierender Effekt der cGK auf die Aktivität der Rho-Kinase (ROCK, ein Downstream-Effektor von RhoA), und damit eine Beschleunigung der synaptischen Vesikel-Endozytose nachgewiesen werden [233]. Ob die cGKII auch in die Regulation der Rho-vermittelten Endozytose bzgl. der Membranlokalisierung von AQP2 in der Niere eingreift, bleibt vorerst offen.

Zusammenfassend deuten die Daten der vorliegenden Arbeit darauf hin, dass in cGKII-KO-Mäusen das Gleichgewicht aus Exo- und Endozytose von AQP2 verschoben ist, so dass eine höhere Anzahl an Wasserkanälen in der Membran verbleibt und damit vermehrt Wasser rückresorbiert wird (dargestellt in Abb. 34). Während das Vasopressin/cAMP/PKA-Signalsystem die Exozytose der AQP2-haltigen Vesikel begünstigt, fördert das NP/cGMP/cGKII-Signalsystem endozytische Prozesse oder verhindert die Exozytose. Eine mögliche Verbindung der beiden gegensätzlich wirkenden Systeme könnte die Aktivierung von NPR-C-Rezeptoren darstellen. Bei hypoosmolaren Bedingungen würde (neben der Verminderung des Vasopressin-Spiegels) die Bindung von natriuretischen Peptiden an NPR-C unabhängig von der cGKII zu einer Hemmung der Aktivität der Adenylat-Cyclase führen [5]. Hierdurch wird intrazellulär der cAMP-Spiegel gesenkt und damit die Exozytose-Rate vermindert, was auch erklären könnte, weshalb der Anstieg der Diurese von cGKII-KO-Mäusen nach WL nicht vollständig unterbleibt. Physiologisch herrscht im Organismus unter normalen Umständen eher ein anti-diuretischer Zustand vor, da hier eine übermäßige Wasserzufuhr und damit eine hypotone Volumenexpansion nicht gegeben ist. Somit ist normalerweise eine verstärkte Endozytose nicht nötig, das NP/cGMP/cGKII-System ist nicht aktiviert und das Gleichgewicht der AQP2-Membranlokalisation in Richtung Exozytose verschoben. Interessanterweise erschien das Urin-Volumen von cGKII-KO-Tieren auch bei den weiteren analysierten Bedingungen tendenziell erniedrigt, u.a. auch bei Fastenversuchen (siehe auch Tab. 9: Metabolische Parameter unter Fasten-Bedingungen Abb. 16), so dass hier möglicherweise eine geringfügige basale Funktion des NP/cGMP/cGKII-Systems bei der Endozytose AQP2-haltiger Vesikel zum Tragen kommt. Augenscheinlich wird diese Gleichgewichtsverschiebung zwischen Exo-/und Endozytose im cGKII-KO allerdings erst nach

einer hypotonen Volumenexpansion und damit einer Aktivierung des NP/cGMP-Systems. Hier unterbleiben durch die cGKII-Defizienz möglicherweise für die Endozytose wichtige Phosphorylierungen, u.a. von Ser261 und/oder Ser264 an AQP2 sowie evtl. weiterer Regulatoren der Endozytose, so dass AQP2 weiterhin in der Membran lokalisiert vorliegt und der Wassereinstrom in die Zelle nicht unterbunden werden kann.

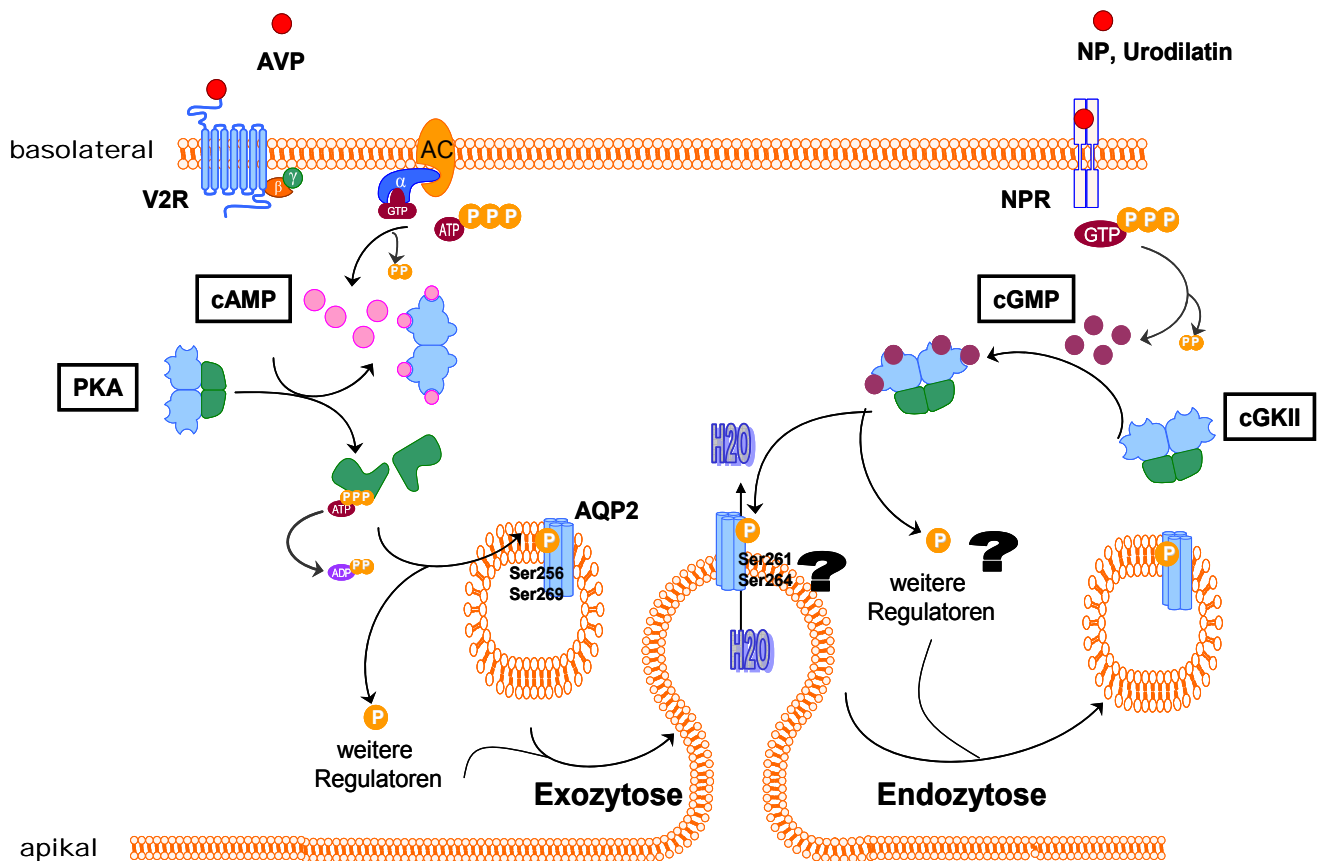


Abb. 34: Postuliertes Modell der Regulation der Membranlokalisation von AQP2

Die Lokalisation von Aquaporin 2 (AQP2) in der Membran wird über ein Gleichgewicht aus Exozytose und Endozytose reguliert. Die Exozytose (links) wird hauptsächlich über das AVP/cAMP/PKA-System aktiviert, führt zur verstärkten Membran-Akkumulation von AQP2 und ist damit vorderrangig bei physiologischen Prozessen, die eine Anti-Diurese erfordern, von Bedeutung. Im Gegensatz dazu wird die Endozytose (rechts) über das NP/cGMP/cGKII-System gesteuert, welches bei Prozessen, die eine Diurese erfordern, aktiviert wird. Weitere Erklärungen siehe Text.

D.3.4 Die cGKII ist nach hypotoner Volumenbelastung an der Ionenausscheidung beteiligt

Neben der Diurese war nach der Applikation der hypotonen Lösung im cGKII-KO auch die Ionenausscheidung beeinträchtigt. Nach der ersten Urin-Sammelperiode zeigte sich hierbei, dass sowohl die Natrium- als auch die Chlorid-Exkretion signifikant, sowie die Kalium-Exkretion tendenziell erniedrigt war (Abb. 24, Tab. 11). Vor allem die verminderte Natrium-Ausscheidung konnte im KO selbst nach dem vollständigen Sammelzeitraum von 6h nicht kompensiert werden. Interessanterweise erschien die Natrium-Exkretion im cGKII-KO bereits unter sham-Bedingungen erniedrigt. Da Aldosteron ein wichtiges Hormon bei der Einstellung des Natrium-Haushaltes darstellt, wurde zunächst die Aldosteron-Serum-Konzentration bestimmt, bevor mögliche, durch die cGKII regulierte Kanäle, allen voran ENaC, näher untersucht wurden.

D.3.4.1 Die hypotone Volumenexpansion führt zur Steigerung des Aldosteron-Spiegels und moduliert die ENaC-Expression

Bei der Analyse der Aldosteron-Konzentrationen wurde bereits unter sham-Bedingungen (Abb. 26) ein gesteigerter Plasmaspiegel der cGKII-KO-Tiere, verglichen mit dem WT, festgestellt. Diese Daten stehen im Gegensatz zu vorangegangenen Untersuchungen, bei welchen kein Unterschied zwischen cGKII-KO und WT bei der Aldosteron-Konzentration detektiert wurde [223]. Die Aldosteron-Bestimmung erfolgte hierbei allerdings unter anderen experimentellen Bedingungen; es wäre denkbar, dass im Rahmen der vorliegenden Arbeit durch die Schlundsondierung der Mäuse eine Stress-Antwort induziert wurde. Eine Reihe von Publikationen weist auf eine RAAS-assozierte Stress-Reaktion hin, die mit einer Natrium-Retention sowie Bluthochdruck einhergeht (reviewed in [92]). Bei der immunhistochemischen Untersuchung wurde damit einhergehend im sham-behandelten KO, verglichen mit dem WT, eine tendenziell leicht erhöhte Expression von ENaC im Cortex sowie vereinzelt auch in äußer-medullären Bereichen detektiert (Abb. 28). Möglicherweise war die RAAS-assozierte Stress-Antwort im KO stärker ausgeprägt, wodurch die basal unter sham-Bedingungen erniedrigte Natrium-Ausscheidung erklärt werden kann. Um die Aldosteron-induzierte Stress-Reaktion zu unterbinden und somit Aldosteron-unabhängige regulatorische Prozesse isolierter betrachten zu können, wären Untersuchungen denkbar, bei denen der Mineralocorticoid-Rezeptor (z.B. durch Spironolacton oder Eplerenon) antagonisiert wird.

Nach der hypotonen Volumenbelastung stiegen die Aldosteron-Konzentrationen in beiden Genotypen auf einen vergleichbaren Wert an. Augenscheinlich wird durch die verminderte Plasma-Osmolarität die Aldosteron-Freisetzung aus der Nebenniere gesteigert, um Natrium-Verluste zu vermeiden. Die erhöhten Aldosteronspiegel führten, wie die immunhistochemische Analyse zeigte, sowohl beim WT als auch beim KO zu einem Anstieg der corticalen ENaC-Expression (Abb. 28). Im Gegensatz dazu wurde in der Medulla kaum ein Signal detektiert. Da allerdings bei Aldosteron-behandelten Ratten auch eine deutliche ENaC-Aktivität in medullären

Bereichen beobachtet werden konnte [70], wurde zur Signalverstärkung die Membran-Expression von ENaC in Plasma-Membran-Präparationen der renalen Medulla von WL-behandelten Tieren (bezogen auf sham-Behandlung) im Western Blot quantifiziert (Abb. 27). Hierbei wurde weder im WT noch im KO eine Änderung ermittelt, so dass, zumindest bei der hypotonen Volumenexpansion, der Kanal im medullären Sammelrohr nicht über eine Änderung des Membraneinbaus reguliert wird. Abschließend wurde die Natriurese nach WL unter exogener Hemmung des ENaC durch Gabe von Amilorid untersucht (Abb. 29). Es zeigte sich, dass der Unterschied zwischen WT und KO zwar vermindert, jedoch nicht ganz aufgehoben werden konnte, was darauf hindeutet, dass vermutlich noch weitere Ionenkanäle an der veränderten Natriurese im KO beteiligt sind (siehe unten). Wie bereits eingangs erwähnt, reguliert u.a. osmotischer Stress, z.B. hypotoner Schock, den ENaC Liganden-unabhängig. Hierbei wird die Natrium-Rückresorption durch einen Anstieg der in der apikalen Membran lokalisierten Kanäle stimuliert, diese Translokation ist vermutlich vermittelt durch verschiedene Klassen von Kinasen, u.a. Protein-Tyrosin-Kinasen und Rezeptor-Tyrosin-Kinasen [162], [188]. 2011 konnte weiterhin gezeigt werden, dass auch Serin/Threonin-Kinasen durch hypotonen Stress reguliert werden. In Myozyten erfolgte die Aktivierung der Protein-Kinase N1 (PKN1) durch die Volumenzunahme der Zellen, die mit osmotischem Stress einhergeht [110], so dass auch in renalen Sammelrohr-Zellen eine derartige Beeinflussung der cGKII-Aktivität denkbar wäre. Ob und inwieweit eine nachfolgende cGKII-vermittelte Regulation von ENaC eine Rolle spielt, kann mit der im Rahmen dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse nicht sicher bestätigt werden. Die Resultate deuten darauf hin, dass die cGKII möglicherweise einen hemmenden Effekt auf die ENaC-vermittelte Natrium-Rückresorption ausüben könnte. In Zellkultur wurde anhand von polarisierten *Xenopus* 2F3-Zellen eine ANP- bzw. cGMP-induzierte Minderung der Offenwahrscheinlichkeit des Kanals demonstriert [86]. Auch in Lungen-Epithelzellen humanen Ursprungs konnte eine NO/cGMP-abhängige Hemmung des ENaC-vermittelten transepithelialen Natrium-Transports beobachtet werden [23]. Im Gegensatz dazu wurde kürzlich eine Aktivierung des Kanals durch die cGKII in Osteoblasten gezeigt. Diese Arbeit stellte erstmals einen Zusammenhang zwischen ENaC und der Kinase her [43]. Weiterhin berichten die Autoren von einer signifikant verminderten Expression der α -ENaC-Untereinheit im Knochengewebe von cGKII-KO-Mäusen, allerdings wurde die Expression der anderen Untereinheiten nicht untersucht. Die immunhistochemische Analyse der β -Untereinheit in der vorliegenden Arbeit deutet im renalen Cortex tendenziell auf eine leicht erhöhte Expression hin, eine exaktere quantitative Analyse wurde allerdings nicht durchgeführt. Die weiteren Untereinheiten wurden in Ermangelung spezifischer Antikörper in der Niere ebenfalls nicht überprüft, so dass zum aktuellen Stand nicht klar ist, ob die verminderte ossäre α -ENaC-Expression im cGKII-KO auch renal zum Tragen kommt. Neben einer direkten Beeinflussung der Expression bzw. einer direkten Interaktion zwischen ENaC und der cGKII existiert aufgrund der vielfältigen regulatorischen Prozesse, die den ENaC modulieren, eine Fülle von weiteren Möglichkeiten, wie die ENaC-vermittelte Natrium-Rückresorption indirekt durch die cGKII gesteuert sein könnte. Eine potenzielle Verbindung könnte bei der Regulation von ENaC

durch die MAP-Kinase (MAPK) bestehen. Wie bereits einleitend erläutert (S.23), bewirkt die MAPK-K-vermittelte Phosphorylierung des Kanals eine erleichterte Bindung von NEDD 4-2, wodurch die Degradation von ENaC eingeleitet wird [151], [212], [214]. Verschiedene Arbeiten deuten auf eine Überschneidung der cGMP-abhängigen mit den MAPK-vermittelten Signalwegen hin, u.a. wurde kürzlich in Osteocyten eine Beteiligung der cGKII bei der Östradiol-induzierten Aktivierung der MAPK zur Verhinderung der Apoptose gezeigt [144]. Da die MAPK in diversen Zellen, u.a. auch in renalen Epithelzellen durch hypoosmotischen Stress aktiviert wird [46], könnte die MAPK-vermittelte ENaC-Degradation eine Gegenregulation zur Aldosteron-vermittelten ENaC-Aktivierung darstellen. Sollte die cGKII auch im Sammelrohr zu einer Aktivierung der MAPK beitragen, wären die im cGKII-KO beobachteten Effekte bzgl. der verminderten Natriurese nach einer hypotonen Volumenexpansion erklärbar, da durch die cGKII-Defizienz letztlich die Degradation von ENaC vermindert werden würde und folglich mehr Kanäle in der apikalen Membran präsent wären. Eine quantitative Untersuchung von Plasmamembran-Präparationen aus dem renalen Cortex nach WL-Behandlung der Mäuse (analog zu der bereits für medulläre Bereiche durchgeführten Analyse) könnte einen ersten Hinweis darauf geben, ob die Membranexpression von ENaC im CCT im cGKII-KO verändert ist.

Unter der Annahme, dass die cGKII als Effektorprotein der natriuretischen Peptide einen hemmenden Einfluss auf ENaC ausübt, sollten zur Analyse außerdem weitere Versuchsbedingungen neben der hypotonen Volumenexpansion gewählt werden, da hierbei augenscheinlich eher eine Aktivierung als eine Hemmung des Kanals stattfindet. Interessanterweise konnten bei der hier vorliegenden Arbeit unter hypertonen Stresssituationen keine Unterschiede zwischen WT und cGKII-KO in der Natriurese beobachtet werden. Bei der Applikation einer hypertonen Lösung (Abb. 20) wurden die Mäuse lediglich einer kurzfristigen Erhöhung der Plasmaosmolarität ausgesetzt; möglicherweise findet eine cGKII-vermittelte Regulation des ENaC erst unter längerfristigem hypertonen Stress statt. Eine weitere untersuchte Bedingung betraf die Natriurese bei Hochsalz-Diäten (Tab. 8), allerdings hatten die Mäuse hier die Möglichkeit, die gesteigerte Salzaufnahme durch eine erhöhte Wasserzufuhr zu kompensieren, so dass die Plasmaosmolarität sich wohl nicht grundlegend änderte. Um die ENaC-vermittelte Natriurese unter längerfristigem hypertonen Stress zu analysieren, sollten diese Versuche deshalb nochmals unter Wasserrestriktion wiederholt werden.

Da die Amilorid-induzierte Antagonisierung von ENaC die verminderte Natriurese von cGKII-KO-Tieren nicht vollständig wieder aufheben konnte, müssen hierbei noch andere Kanäle bzw. Transporter eine Rolle spielen. Zu ähnlichen Schlussfolgerungen gelangten die Autoren einer Studie, die den Einfluss eines hypotonen Schocks auf alveolare Epithelzellen untersuchten. Auch hier konnte der Anstieg des transmembranären Ionenflusses nach hypotonem Stress durch Amilorid nicht vollständig geblockt werden [51]. Außerdem bietet eine cGKII-vermittelte Regulation von ENaC keine Erklärung für die weiteren beobachteten Defizite in der Ionenausscheidung. Zwar konnte kürzlich eine NO-abhängige Hemmung der Chlorid-Reabsorption durch ENaC gezeigt werden [171], wodurch die verringerte Chlorid-Ausscheidung

bedingt sein könnte, allerdings werden durch hypotonen Stress eine Reihe weiterer Ionen-transport-Proteine aktiviert. Im Folgenden soll deshalb abschließend kurz auf die mögliche cGKII-abhängige Regulation dieser Proteine eingegangen werden.

D.3.4.2 Mögliche Interaktionen mit weiteren Ionenkanälen

Entlang des Nephrons wird die Ionen-Rückresorption über eine Vielzahl an Transportproteinen gewährleistet. Die in der vorliegenden Arbeit erhaltenen Ergebnisse deuten vorderrangig auf Defekte des Natrium- bzw. Chlorid-Transports hin, weshalb der Fokus auf hierbei beteiligten Transport-Proteinen liegt. Im Bürstensaumepithel des proximalen Tubulus erfolgt die Natrium-Aufnahme in erster Linie über den Na^+/H^+ -Austauscher NHE3, ein Großteil der gefilterten Natrium-Menge wird bereits in diesem Abschnitt des Nephrons rückresorbiert. Dieser Antiporter weist deshalb per se schon hohe Transportkapazitäten auf, er kann jedoch über eine Zunahme des Zellvolumens, ausgelöst durch hypotone Volumenbelastung, noch zusätzlich aktiviert werden [83], [252]. Die im Rahmen dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse würden eher auf eine cGKII-abhängige Hemmung von NHE3 hindeuten. Auch andere Untersuchungen berichten von einer Hemmung des Transporters durch natriuretische Peptide bzw. NO/cGMP [80], [137]. Sollte die cGKII also NHE3 inhibieren, würde dieser Mechanismus möglicherweise der Aktivierung bei hypotonen Stress-Bedingungen entgegenwirken. Allerdings war der pH-Wert der analysierten Urin-Proben bei WT und KO nicht unterschiedlich (Tab. 11), so dass eine Beteiligung des NHE3 an der veränderten Natriurese im cGKII-KO unter den betrachteten Bedingungen, wenn überhaupt, nur eine untergeordnete Rolle spielt. Auch würde eine Regulation von NHE3 lediglich eine Erklärung für die unterschiedliche Natrium-, nicht jedoch für die Chlorid-Ausscheidung bieten.

Im dicken aufsteigenden Ast der Henle-Schleife wird die Ionenrückresorption hauptsächlich durch den $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Cl}^-$ -Cotransporter (NKCC2) gewährleistet. Ein Water Load mit 8%-iger Sucrose-Lösung führte in Mäusen zu einer Verminderung der NKCC2-Expression [201], wodurch die Rückresorption von Natrium, Kalium und Chlorid reduziert wird, so dass sich auch die Wiederaufnahme von Wasser im Rahmen der Gegenstromaufkonzentrierung vermindert. Die Chlorid-Absorption in der Henle-Schleife wird auf apikaler Seite vollständig durch NKCC2 vermittelt [93] und kann durch ANP in physiologischen Konzentrationen signifikant gehemmt werden [8]; ähnliche Effekte werden auch mit Urodilatin erzielt [157]. Eine cGKII-abhängige Hemmung des Co-Transporters nach einer hypotonen Volumenexpansion würde folglich die gesteigerte Natrium- und Chlorid-Rückresorption im cGKII-KO begründen können. Allerdings wird diskutiert, dass die Hemmung von NKCC2 durch natriuretische Peptide/cGMP unabhängig von cGMP-abhängigen Proteinkinasen, stattdessen durch Stimulierung der PDE2 und damit einer Verminderung der cAMP-Spiegel bewirkt wird, welche einen stimulatorischen Effekt ausüben [7]. Abgesehen von der zitierten Arbeit existieren bis heute jedoch nur wenige Untersuchungen, die cGMP-vermittelte Regulationen des NKCC2 betreffen, so dass eine potentielle Beeinflussung durch die cGKII nicht ausgeschlossen werden kann.

Im distalen Tubulus ist der thiazid-sensitive NaCl-Cotransporter (NCC) von herausragender Bedeutung für die Rückresorption von Natrium und Chlorid. Die Phosphorylierung dieses Transporters wird durch intrazelluläre Absenkung der Chlorid-Spiegel bewirkt und führt zu einer Aktivierung des Kanals [169]. Hierbei spielt insbesondere die Regulation von NCC durch WNK/SPAK eine wichtige Rolle, eine Beeinflussung des Cotransporters durch natriuretische Peptide bzw. cGMP ist bislang nicht gezeigt.

Schließlich könnten neben apikalen Transportproteinen auch basolaterale Kanäle durch die cGKII reguliert werden. Während Natrium über die Na^+/K^+ -ATPase aus der Zelle zurück ins Blut gepumpt wird, verlässt Chlorid diese über basolaterale Chlorid-Kanäle. Renal sind hier v.a. ClC-Ka und ClC-Kb von Bedeutung, welche mit Ausnahme des proximalen Tubulus entlang des gesamten Nephrons exprimiert sind [63], [242]. NO bzw. cGMP führt zu einer Aktivierung solcher Chlorid-Kanäle in Lungen-Epithelzellen [56]; des Weiteren wurde eine Beteiligung der cGKII beim Chloridtransport im Gastrointestinaltrakt gezeigt [237]. Inwieweit die Kinase solche Chlorid-Kanäle auch in der Niere modulieren kann, bleibt zum gegenwärtigen Stand der Forschung offen.

Da aufgrund mangelnder spezifischer Antikörper noch keine detaillierte Untersuchung der Lokalisation der cGKII in den verschiedenen Nephron-Abschnitten durchgeführt werden konnte, ergeben sich vielfältige Möglichkeiten, wodurch die veränderte Ionenausscheidung im cGKII-KO erklärt werden könnte. Bislang konnte eine hinreichende Spezifität des im Rahmen dieser Arbeit generierten cGKII-Antikörpers nur im Western Blot gewährleistet werden, weshalb eine weitere Aufreinigung der Antikörper-Seren nötig ist, um diesen Antikörper auch für immunhistochemische Methoden verwenden zu können. Nachfolgend würden Koloalisations-Analysen mit diesem cGKII-Antikörper sowie Antikörpern gegen spezifische Marker-Proteine in distinkten Nephronabschnitten eine wichtige Grundlage bilden, um mögliche Effektorproteine besser eingrenzen zu können. Weiterhin könnten zur genaueren Aufklärung verschiedene Diuretika bei Water Load-Versuchen analog der bereits durchgeführten Amilorid-Versuche appliziert werden, so würde z.B. die Gabe von Schleifendiuretika einen Hinweis auf die Beteiligung von NKCC2 liefern.

E. Zusammenfassung

Bei der Protein-Kinasen-vermittelten Signaltransduktion handelt es sich um einen wichtigen Mechanismus, um externe Informationen in Zellen weiterzuleiten und zu verstärken, was nachfolgend zu unterschiedlichen Reaktionen dieser Zellen, abhängig vom extrazellulären Signal (z.B. Hormone wie natriuretische Peptide) und dessen zugehörigem Signalweg, führt. Obwohl die Rolle von natriuretischen Peptiden, deren second messenger cGMP und dessen Effektoren, der cGMP-abhängigen Proteinkinasen (cGKs), in anderen Organen bereits gut erforscht wurde, existieren bislang nur wenige Hinweise bezüglich cGMP-abhängiger Regulations-Prozesse in der Niere. Im Rahmen dieser Arbeit wurde deshalb die renale Funktion der cGKII, einer cGK-Isoform, anhand von cGKII-defizienten Mäusen eingehender charakterisiert. Hierzu wurde zunächst ein spezifischer Antikörper generiert, indem der N-terminale Bereich der Kinase in *E. coli* exprimiert, aufgereinigt und in Kaninchen injiziert wurde. Das entsprechende Antiserum wurde aufgereinigt und mit den erhaltenen Antikörpern im Western Blot die Expression der cGKII in corticalen sowie inner-medullären, schwächer auch in äußer-medullären Strukturen nachgewiesen. Zur Untersuchung der physiologischen Relevanz dieser Expression bezüglich der basalen Nierenfunktion, der forcierten Urin-Aufkonzentrierung sowie der Urin-Verdünnung wurden mit WT- und cGKII-KO-Mäusen unterschiedliche Stoffwechseluntersuchungen in Metabolismus-Käfigen durchgeführt. Hierbei konnten unter normalen sowie unter Renin-stimulatorischen und inhibitorischen Bedingungen bzgl. der ausgeschiedenen Urin- sowie der Kalium-, Natrium- und Chlorid-Mengen im KO lediglich tendenziell Unterschiede zum WT detektiert werden, sodass die cGKII bei der basalen Nierenfunktion nur eine untergeordnete Rolle spielt. Weiterhin konnte eine Beteiligung der Kinase bei der Urinaufkonzentrierung ausgeschlossen werden, untersucht anhand von Durstversuchen sowie weiteren Versuchen, bei denen die orale Applikation einer Salz-Lösung zu einer hypertonen Volumenexpansion führte. Bei der forcierten Urinverdünnung, welche durch Applikation einer hypotonen Lösung (Water Load, WL) induziert wurde, wurde hingegen im cGKII-KO eine signifikante Verminderung der Diurese sowie der Ionenausscheidung, verglichen mit dem WT, detektiert. Da beide Genotypen nach WL eine erhöhte Aldosteronkonzentration im Serum aufwiesen, schien ENaC bei der Verhinderung eines Natriumverlusts infolge des WL eine wichtige Rolle zu spielen. Die veränderte Natriurese im cGKII-KO nach der hypotonen Volumenexpansion ließ sich jedoch nicht eindeutig auf eine gestörte ENaC-Regulation zurückführen. Versuche mit Amilorid zeigten, dass die Unterschiede in der Natriumausscheidung zwischen KO und WT durch die exogene Hemmung von ENaC nicht vollständig aufgehoben werden konnten, so dass hierbei weitere Ionenkanäle beteiligt sein sollten. Zukünftige Untersuchungen werden dazu beitragen, die der veränderten Natriurese zugrundeliegenden, cGMP/cGKII-abhängigen Regulationen des ENaC und weiterer Kanäle zu klären. Indes wurden die Unterschiede in der Diurese im KO eindeutig durch eine erhöhte Expression von Aquaporin 2 in apikalen Plasmamembranen von Sammelrohrzellen und damit einer verstärkten Wasserrückresorption ausgelöst. Die gesteigerte membran-assoziierte AQP2-Expression lag nicht in einer veränderten Phosphorylierung von AQP2 an Ser256 begründet, da

selbige in beiden Genotypen nach WL gleichermaßen abnahm. Möglicherweise übt die cGKII eine Funktion bei der Regulation der Endozytose von AQP2 aus und fungiert damit als Gegenregulationsmechanismus zur PKA-vermittelten Exozytose. Eine Interaktion zwischen cGKII und AQP2 und damit möglicherweise eine direkte Phosphorylierung konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht gezeigt werden, so dass bei dieser Regulation auch die Beteiligung weiterer Downstream-Effektoren nicht ausgeschlossen werden kann. Nichtsdestotrotz ermöglicht diese Arbeit einen essenziellen Einblick in renale cGKII-abhängige Signaltransduktionsmechanismen, welche zu einem besseren Verständnis der regulatorischen Grundlagen, die zu einer Urinverdünnung führen, beiträgt. Des Weiteren wird hierdurch erstmals ein Zusammenhang zwischen dem diuretischen und natriuretischen Effekt natriuretischer Peptide und beteiligter intrazellulärer Downstream-Effektoren hergestellt.

F. Summary

Signal transduction by protein kinases is an important mechanism to forward and amplify external information in cells. In turn, the cells respond with various patterns, depending on the extracellular signal (e.g. hormones like natriuretic peptides) and the corresponding signalling pathway. Although the role of natriuretic peptides (including their second messenger cGMP and its effectors, cGMP-dependent kinases (cGKs)) is quite well understood in other vertebrate organs, only a few hints exist regarding the function of these signalling molecules in the kidney. In this thesis, the renal function of cGKII, a cGK isoform, was investigated using cGKII-deficient mice. Therefore, a specific antibody was generated by expression of the N-terminal region of cGKII in *E. coli*, purification and subsequent injection in rabbits. Using purified antibodies in immuno blots, cGKII was shown to be present in cortical as well as inner-medullary, and, to a lesser extent, in outer-medullary renal sections. Metabolic cage experiments with WT- and cGKII-KO mice were performed in order to investigate the physiological relevance of this expression concerning basal renal function and forced urinary concentration as well as dilution processes. Regarding normal, renin-stimulatory and renin-inhibitory conditions, no significant differences with respect to excreted urine-, potassium-, sodium- and chloride-amounts could be detected between KO- and WT-animals. Consequently, cGKII is involved only to a minor extent in the regulation of basal kidney function. Furthermore, a cGKII-dependent involvement in renal concentration ability could be excluded via starving experiments and via additional experiments, where oral application of a salt solution led to a hypertonic volume load. However, when urinary dilution was forced by application of a hypotonic solution (water load, WL) in cGKII-KO-mice, a significantly lower diuresis and ion excretion was detected compared to water loaded WT-animals. As both genotypes exhibited enhanced blood aldosterone concentrations following WL, it seemed that ENaC could play a prominent role in prevention of a sodium loss due to WL. Albeit, the altered natriuresis following a hypotonic volume expansion could not conclusively be affiliated to an altered regulation of ENaC, since the observed differences in sodium excretion between WT and KO were not completely abolished by co-administration of amiloride, a specific ENaC antagonist. Consequently, further ion channels have to be involved in this complex pathway and future investigations with regard to cGMP/cGKII-dependent regulatory processes are warranted. However, the differences regarding diuresis in cGKII-KO-mice were clearly caused by an enhanced expression of Aquaporin 2 in apical plasma membranes of collecting duct cells resulting in an enhanced water reabsorption. The altered membrane-associated AQP2-expression was not induced by a different phosphorylation of AQP2 at Ser256, because phosphorylation at this site decreased similarly in both genotypes following WL. Apparently, cGKII might exert a function in the regulation of AQP2-endocytosis and serve as a counter-regulatory mechanism to PKA-induced exocytosis. In this work, an interaction between cGKII and AQP2, and therefore a possible direct phosphorylation could not be demonstrated, so that an involvement of further downstream effectors in this regulation cannot be excluded. Nevertheless, this thesis provided crucial insight into cGKII-dependent signalling mechanisms in the kidney

F. Summary

regarding dilution processes and relates the diuretic and natriuretic response of natriuretic peptides to intracellular downstream effectors.

G. Literaturverzeichnis

- [1] ACKERMANN, TERESA F ; BOINI, KRISHNA M ; BEIER, NORBERT ; SCHOLZ, WOLFGANG ; FUCHSS, THOMAS ; LANG, FLORIAN: EMD638683, a novel SGK inhibitor with antihypertensive potency. In: *Cellular physiology and biochemistry: international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology* Bd. 28 (2011), Nr. 1, S. 137–146. — PMID: 21865856
- [2] ALLEN, M J ; ANG, V T ; BENNETT, E D ; JENKINS, J S: Atrial natriuretic peptide inhibits osmolality-induced arginine vasopressin release in man. In: *Clinical science (London, England: 1979)* Bd. 75 (1988), Nr. 1, S. 35–39. — PMID: 2970360
- [3] ALLEVA, KARINA ; CHARA, OSVALDO ; AMODEO, GABRIELA: Aquaporins: Another piece in the osmotic puzzle. In: *FEBS Letters* Bd. 586 (2012), Nr. 19, S. 2991–2999
- [4] ALVAREZ DE LA ROSA, DIEGO ; NAVARRO-GONZÁLEZ, JUAN F ; GIRALDEZ, TERESA: ENaC modulators and renal disease. In: *Current molecular pharmacology* Bd. 6 (2013), Nr. 1, S. 35–43. — PMID: 23547933
- [5] ANAND-SRIVASTAVA, MADHU B: Natriuretic peptide receptor-C signaling and regulation. In: *Peptides* Bd. 26 (2005), Nr. 6, S. 1044–1059. — PMID: 15911072
- [6] ANDERSEN, LARS JUEL ; ANDERSEN, JENS LUNDBÆK ; PUMP, BETTINA ; BIE, PETER: Natriuresis induced by mild hypernatremia in humans. In: *American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* Bd. 282 (2002), Nr. 6, S. R1754–R1761. — PMID: 12010758
- [7] ARES, GUSTAVO R ; CACERES, PAULO ; ALVAREZ-LEEFMANS, FRANCISCO J ; ORTIZ, PABLO A: cGMP decreases surface NKCC2 levels in the thick ascending limb: role of phosphodiesterase 2 (PDE2). In: *American journal of physiology. Renal physiology* Bd. 295 (2008), Nr. 4, S. F877–887. — PMID: 18684888 PMCID: PMC2576138
- [8] BAILLY, C: Effect of luminal atrial natriuretic peptide on chloride reabsorption in mouse cortical thick ascending limb: inhibition by endothelin. In: *Journal of the American Society of Nephrology: JASN* Bd. 11 (2000), Nr. 10, S. 1791–1797. — PMID: 11004208
- [9] BARILE, MARIA ; PISITKUN, TRAIRAK ; YU, MING-JIUN ; CHOU, CHUNG-LIN ; VERBALIS, MICHAEL J. ; SHEN, RONG-FONG ; KNEPPER, MARK A.: Large Scale Protein Identification in Intracellular Aquaporin-2 Vesicles from Renal Inner Medullary Collecting Duct. In: *Molecular & Cellular Proteomics* Bd. 4 (2005), Nr. 8, S. 1095–1106. — PMID: 15905145
- [10] BASU, NIRMALYA ; VISWESWARIAH, SANDHYA SRIKANT: Defying the stereotype: non-canonical roles of the Peptide hormones guanylin and uroguanylin. In: *Frontiers in endocrinology* Bd. 2 (2011), S. 14. — PMID: 22654795 PMCID: PMC3356075
- [11] BAYLIS, P H: Osmoregulation and control of vasopressin secretion in healthy humans. In: *The American journal of physiology* Bd. 253 (1987), Nr. 5 Pt 2, S. R671–678. — PMID: 3318505
- [12] BEDFORD, JENNIFER J ; LEADER, JOHN P ; JING, RENA ; WALKER, LOGAN J ; KLEIN, JANET D ; SANDS, JEFF M ; WALKER, ROBERT J: Amiloride restores renal medullary osmolytes in lithium-induced nephrogenic diabetes insipidus. In: *American journal of physiology. Renal physiology* Bd. 294 (2008), Nr. 4, S. F812–820. — PMID: 18216143
- [13] BEDFORD, JENNIFER J ; WEGGERY, SUSAN ; ELLIS, GAYE ; McDONALD, FIONA J ; JOYCE, PETER R ; LEADER, JOHN P ; WALKER, ROBERT J: Lithium-induced nephrogenic diabetes insipidus: renal effects of amiloride. In: *Clinical journal of the American Society of Nephrology: CJASN* Bd. 3 (2008), Nr. 5, S. 1324–1331. — PMID: 18596116 PMCID: PMC2518801
- [14] BEESLEY, A H ; HORNBY, D ; WHITE, S J: Regulation of distal nephron K⁺ channels (ROMK) mRNA expression by aldosterone in rat kidney. In: *The Journal of physiology* Bd. 509 (Pt 3) (1998), S. 629–634. — PMID: 9596787 PMCID: PMC2230996
- [15] BENDER, ANDREW T ; BEAVO, JOSEPH A: Cyclic nucleotide phosphodiesterases: molecular regulation to clinical use. In: *Pharmacological reviews* Bd. 58 (2006), Nr. 3, S. 488–520. — PMID: 16968949
- [16] BENGHA, GHEORGHE: The first discovered water channel protein, later called aquaporin 1: Molecular characteristics, functions and medical implications. In: *Molecular Aspects of Medicine* Bd. 33 (2012), Nr. 5–6, S. 518–534
- [17] BENOS, D J: Amiloride: a molecular probe of sodium transport in tissues and cells. In: *The American journal of physiology* Bd. 242 (1982), Nr. 3, S. C131–145. — PMID: 7039345

-
- [18] BERL, TOMAS ; QUITTAT-PELLETIER, FRIEDERIKE ; VERBALIS, JOSEPH G ; SCHRIER, ROBERT W ; BICHET, DANIEL G ; OUYANG, JOHN ; CZERWIEC, FRANK S ; SALTWATER INVESTIGATORS: Oral tolvaptan is safe and effective in chronic hyponatremia. In: *Journal of the American Society of Nephrology: JASN* Bd. 21 (2010), Nr. 4, S. 705–712. — PMID: 20185637 PMCID: PMC2844305
 - [19] BERNIER, VIRGINIE ; MORELLO, JEAN-PIERRE ; ZARRUK, ALEXANDRO ; DEBRAND, NICOLAS ; SALAHPOUR, ALI ; LONERGAN, MICHÈLE ; ARTHUS, MARIE-FRANÇOISE ; LAPERRIÈRE, ANDRÉ ; BROUARD, RÉMI ; U. A.: Pharmacologic chaperones as a potential treatment for X-linked nephrogenic diabetes insipidus. In: *Journal of the American Society of Nephrology: JASN* Bd. 17 (2006), Nr. 1, S. 232–243. — PMID: 16319185
 - [20] BIANCONI, EVA ; PIOVESAN, ALLISON ; FACCHIN, FEDERICA ; BERAUDI, ALINA ; CASADEI, RAFFAELLA ; FRABETTI, FLAVIA ; VITALE, LORENZA ; PELLER, MARIA CHIARA ; TASSANI, SIMONE ; U. A.: An estimation of the number of cells in the human body. In: *Annals of human biology* Bd. 40 (2013), Nr. 6, S. 463–471. — PMID: 23829164
 - [21] BICHET, DANIEL G: Nephrogenic diabetes insipidus. In: *Advances in chronic kidney disease* Bd. 13 (2006), Nr. 2, S. 96–104. — PMID: 16580609
 - [22] BIEL, M ; SAUTTER, A ; LUDWIG, A ; HOFMANN, F ; ZONG, X: Cyclic nucleotide-gated channels--mediators of NO:cGMP-regulated processes. In: *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology* Bd. 358 (1998), Nr. 1, S. 140–144. — PMID: 9721016
 - [23] BLOUQUIT-LAYE, SABINE ; DANNHOFFER, LUC ; BRAUN, CAMILLE ; DINH-XUAN, ANH-TUAN ; SAGE, EDOUARD ; CHINET, THIERRY: Effect of nitric oxide on epithelial ion transports in noncystic fibrosis and cystic fibrosis human proximal and distal airways. In: *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology* Bd. 303 (2012), Nr. 7, S. L617–625. — PMID: 22773693
 - [24] BOLAÑOS, L ; COLINA, I ; PURROY, A: Intracerebroventricular infusion of hypertonic NaCl increases urinary cGMP in healthy and cirrhotic rats. In: *Archives of physiology and biochemistry* Bd. 107 (1999), Nr. 4, S. 323–333. — PMID: 10779828
 - [25] DE BOLD, A J ; BORENSTEIN, H B ; VERESS, A T ; SONNENBERG, H: A rapid and potent natriuretic response to intravenous injection of atrial myocardial extract in rats. In: *Life sciences* Bd. 28 (1981), Nr. 1, S. 89–94. — PMID: 7219045
 - [26] BOONE, MICHELLE ; KORTENOEVER, MARLEEN ; ROBBEN, JORIS H ; DEEN, PETER M T: Effect of the cGMP pathway on AQP2 expression and translocation: potential implications for nephrogenic diabetes insipidus. In: *Nephrology, dialysis, transplantation: official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association* Bd. 25 (2010), Nr. 1, S. 48–54. — PMID: 19666909
 - [27] BORÁN, MARIELA SUSANA ; BALTRONS, MARÍA ANTONIA ; GARCÍA, AGUSTINA: The ANP-cGMP-protein kinase G pathway induces a phagocytic phenotype but decreases inflammatory gene expression in microglial cells. In: *Glia* Bd. 56 (2008), Nr. 4, S. 394–411. — PMID: 18186083
 - [28] BOULEY, R ; BRETON, S ; SUN, T ; MCLAUGHLIN, M ; NSUMU, N N ; LIN, H Y ; AUSIELLO, D A ; BROWN, D: Nitric oxide and atrial natriuretic factor stimulate cGMP-dependent membrane insertion of aquaporin 2 in renal epithelial cells. In: *The Journal of clinical investigation* Bd. 106 (2000), Nr. 9, S. 1115–1126. — PMID: 11067864 PMCID: PMC301414
 - [29] BOULEY, RICHARD ; HAWTHORN, GAYLE ; RUSSO, LEILEATA M ; LIN, HERBERT Y ; AUSIELLO, DENNIS A ; BROWN, DENNIS: Aquaporin 2 (AQP2) and vasopressin type 2 receptor (V2R) endocytosis in kidney epithelial cells: AQP2 is located in „endocytosis-resistant“ membrane domains after vasopressin treatment. In: *Biology of the cell / under the auspices of the European Cell Biology Organization* Bd. 98 (2006), Nr. 4, S. 215–232. — PMID: 16563128
 - [30] BOULEY, RICHARD ; PASTOR-SOLER, NURIA ; COHEN, ORI ; MCLAUGHLIN, MARGARET ; BRETON, SYLVIE ; BROWN, DENNIS: Stimulation of AQP2 membrane insertion in renal epithelial cells in vitro and in vivo by the cGMP phosphodiesterase inhibitor sildenafil citrate (Viagra). In: *American journal of physiology. Renal physiology* Bd. 288 (2005), Nr. 6, S. F1103–1112. — PMID: 15644488
 - [31] BROWN, DENNIS: The ins and outs of aquaporin-2 trafficking. In: *American journal of physiology. Renal physiology* Bd. 284 (2003), Nr. 5, S. F893–901. — PMID: 12676734
 - [32] BROWN, DENNIS ; HASLER, UDO ; NUNES, PAULA ; BOULEY, RICHARD ; LU, HUA A J: Phosphorylation events and the modulation of aquaporin 2 cell surface expression. In:

-
- Current opinion in nephrology and hypertension* Bd. 17 (2008), Nr. 5, S. 491–498. — PMID: 18695390 PMCID: PMC3774073
- [33] BROWN, RUTH ; QUIRK, JEREMY ; KIRKPATRICK, PETER: Eplerenone. In: *Nature reviews. Drug discovery* Bd. 2 (2003), Nr. 3, S. 177–178. — PMID: 12619638
- [34] BROWNSTEIN, M J ; RUSSELL, J T ; GAINER, H: Synthesis, transport, and release of posterior pituitary hormones. In: *Science (New York, N.Y.)* Bd. 207 (1980), Nr. 4429, S. 373–378. — PMID: 6153132
- [35] BUGAJ, VLADISLAV ; POCHYNYUK, OLEH ; STOCKAND, JAMES D: Activation of the epithelial Na⁺ channel in the collecting duct by vasopressin contributes to water reabsorption. In: *American journal of physiology. Renal physiology* Bd. 297 (2009), Nr. 5, S. F1411–1418. — PMID: 19692483 PMCID: PMC2781343
- [36] CANESSA, C M ; SCHILD, L ; BUELL, G ; THORENS, B ; GAUTSCHI, I ; HORISBERGER, J D ; ROSSIER, B C: Amiloride-sensitive epithelial Na⁺ channel is made of three homologous subunits. In: *Nature* Bd. 367 (1994), Nr. 6462, S. 463–467. — PMID: 8107805
- [37] CARRITHERS, STEPHEN L ; OTT, COBERN E ; HILL, MICHAEL J ; JOHNSON, BRETT R ; CAI, WEIYAN ; CHANG, JASON J ; SHAH, RAJESH G ; SUN, CONGMEI ; MANN, ELIZABETH A ; U. A.: Guanylin and uroguanylin induce natriuresis in mice lacking guanylyl cyclase-C receptor. In: *Kidney international* Bd. 65 (2004), Nr. 1, S. 40–53. — PMID: 14675035
- [38] CASTEEL, DARREN E ; SMITH-NGUYEN, ERIC V ; SANKARAN, BANUMATHI ; ROH, SUNG H ; PILZ, RENATE B ; KIM, CHOEL: A crystal structure of the cyclic GMP-dependent protein kinase I{beta} dimerization/docking domain reveals molecular details of isoform-specific anchoring. In: *The Journal of biological chemistry* Bd. 285 (2010), Nr. 43, S. 32684–32688. — PMID: 20826808 PMCID: PMC2963381
- [39] CEA, LUIS BOLANOS: Natriuretic peptide family: new aspects. In: *Current medicinal chemistry. Cardiovascular and hematological agents* Bd. 3 (2005), Nr. 2, S. 87–98. — PMID: 15853696
- [40] CHA, BOYOUNG ; KIM, JAE HO ; HUT, HANS ; HOGEMA, BORIS M ; NADARJA, JANANI ; ZIZAK, MIRZA ; CAVET, MEGAN ; LEE-KWON, WHASEON ; LOHMANN, SUZANNE M ; U. A.: cGMP inhibition of Na⁺/H⁺ antiporter 3 (NHE3) requires PDZ domain adapter NHERF2, a broad specificity protein kinase G-anchoring protein. In: *The Journal of biological chemistry* Bd. 280 (2005), Nr. 17, S. 16642–16650. — PMID: 15722341
- [41] CHANG, M S ; LOWE, D G ; LEWIS, M ; HELLMISS, R ; CHEN, E ; GOEDEL, D V: Differential activation by atrial and brain natriuretic peptides of two different receptor guanylate cyclases. In: *Nature* Bd. 341 (1989), Nr. 6237, S. 68–72. — PMID: 2570358
- [42] CHANG, S S ; GRUNDER, S ; HANUKOGLU, A ; RÖSLER, A ; MATHEW, P M ; HANUKOGLU, I ; SCHILD, L ; LU, Y ; SHIMKETS, R A ; U. A.: Mutations in subunits of the epithelial sodium channel cause salt wasting with hyperkalaemic acidosis, pseudohypoaldosteronism type 1. In: *Nature genetics* Bd. 12 (1996), Nr. 3, S. 248–253. — PMID: 8589714
- [43] CHEN, JUN ; ZHANG, HENGJIE ; ZHANG, XULING ; YANG, GUOZHU ; LU, LI ; LU, XINGYAN ; WAN, CHAO ; IJIRI, KOSEI ; JI, HONGLONG ; U. A.: Epithelial sodium channel enhanced osteogenesis via cGMP/PKGII/ENaC signaling in rat osteoblast. In: *Molecular biology reports* (2014). — PMID: 24481877
- [44] CHEY, WILLIAM D ; LEMBO, ANTHONY J ; LAVINS, BERNARD J ; SHIFF, STEVEN J ; KURTZ, CAROLINE B ; CURRIE, MARK G ; MACDOUGALL, JAMES E ; JIA, XINWEI D ; SHAO, JAMES Z ; U. A.: Linaclotide for irritable bowel syndrome with constipation: a 26-week, randomized, double-blind, placebo-controlled trial to evaluate efficacy and safety. In: *The American journal of gastroenterology* Bd. 107 (2012), Nr. 11, S. 1702–1712. — PMID: 22986437
- [45] CHIKUDA, HIROTAKA ; KUGIMIYA, FUMITAKA ; HOSHI, KAZUTO ; IKEDA, TOSHIYUKI ; OGASAWARA, TORU ; SHIMOAKA, TAKASHI ; KAWANO, HIROTAKA ; KAMEKURA, SATORU ; TSUCHIDA, ATSUKO ; U. A.: Cyclic GMP-dependent protein kinase II is a molecular switch from proliferation to hypertrophic differentiation of chondrocytes. In: *Genes & development* Bd. 18 (2004), Nr. 19, S. 2418–2429. — PMID: 15466490 PMCID: PMC522991
- [46] CHIRI, SANDRINE ; BOGLIOLO, STÉPHANIE ; EHRENFELD, JORDI ; CIAPA, BRIGITTE: Activation of extracellular signal-regulated kinase ERK after hypo-osmotic stress in renal epithelial A6 cells. In: *Biochimica et biophysica acta* Bd. 1664 (2004), Nr. 2, S. 224–229. — PMID: 15328055
- [47] CHRISTENSEN, BIRGITTE MØNSTER ; MARPLES, DAVID ; KIM, YOUNG-HEE ; WANG, WEIDONG ; FRØKIAER, JØRGEN ; NIELSEN, SØREN: Changes in cellular composition of kidney collecting

- duct cells in rats with lithium-induced NDI. In: *American journal of physiology. Cell physiology* Bd. 286 (2004), Nr. 4, S. C952–964. — PMID: 14613889
- [48] CHRISTENSEN, BIRGITTE MØNSTER ; ZUBER, ANNIE MERCIER ; LOFFING, JOHANNES ; STEHLE, JEAN-CHRISTOPHE ; DEEN, PETER M T ; ROSSIER, BERNARD C ; HUMMLER, EDITH: alphaENaC-mediated lithium absorption promotes nephrogenic diabetes insipidus. In: *Journal of the American Society of Nephrology: JASN* Bd. 22 (2011), Nr. 2, S. 253–261. — PMID: 21051735 PMCID: PMC3029898
- [49] CHRISTENSEN, S ; KUSANO, E ; YUSUFI, A N ; MURAYAMA, N ; DOUSA, T P: Pathogenesis of nephrogenic diabetes insipidus due to chronic administration of lithium in rats. In: *The Journal of clinical investigation* Bd. 75 (1985), Nr. 6, S. 1869–1879. — PMID: 2989335 PMCID: PMC425543
- [50] CURRIE, M G ; FOK, K F ; KATO, J ; MOORE, R J ; HAMRA, F K ; DUFFIN, K L ; SMITH, C E: Guanylin: an endogenous activator of intestinal guanylate cyclase. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* Bd. 89 (1992), Nr. 3, S. 947–951. — PMID: 1346555 PMCID: PMC48362
- [51] DAGENAIS, ANDRE ; TESSIER, MARIE-CLAUDE ; TATUR, SABINA ; BROCHIERO, EMMANUELLE ; GRYGORCZYK, RYSZARD ; BERTHIAUME, YVES: Hypotonic Shock Modulates Na⁺ Current via a Cl⁻ and Ca²⁺/Calmodulin Dependent Mechanism in Alveolar Epithelial Cells. In: *PLoS ONE* Bd. 8 (2013), Nr. 9. — PMID: 24019969 PMCID: PMC3760838
- [52] DEBONNEVILLE, C ; FLORES, S Y ; KAMYNINA, E ; PLANT, P J ; TAUXE, C ; THOMAS, M A ; MÜNSTER, C ; CHRAÏBI, A ; PRATT, J H ; U. A.: Phosphorylation of Nedd4-2 by Sgk1 regulates epithelial Na(+) channel cell surface expression. In: *The EMBO journal* Bd. 20 (2001), Nr. 24, S. 7052–7059. — PMID: 11742982 PMCID: PMC125341
- [53] DEEN, P M ; VERDIJK, M A ; KNOERS, N V ; WIERINGA, B ; MONNENS, L A ; VAN OS, C H ; VAN OOST, B A: Requirement of human renal water channel aquaporin-2 for vasopressin-dependent concentration of urine. In: *Science (New York, N.Y.)* Bd. 264 (1994), Nr. 5155, S. 92–95. — PMID: 8140421
- [54] DENINNO, MICHAEL P: Future directions in phosphodiesterase drug discovery. In: *Bioorganic & medicinal chemistry letters* Bd. 22 (2012), Nr. 22, S. 6794–6800. — PMID: 23046962
- [55] DUNN, STEPHEN R ; QI, ZHONGHUA ; BOTTINGER, ERWIN P ; BREYER, MATTHEW D ; SHARMA, KUMAR: Utility of endogenous creatinine clearance as a measure of renal function in mice. In: *Kidney international* Bd. 65 (2004), Nr. 5, S. 1959–1967. — PMID: 15086941
- [56] DUTA, VALENTIN ; DUTA, FLORENTINA ; PUTTAGUNTA, LAKSHMI ; BEFUS, A DEAN ; DUSZYK, MAREK: Regulation of basolateral Cl(-) channels in airway epithelial cells: the role of nitric oxide. In: *The Journal of membrane biology* Bd. 213 (2006), Nr. 3, S. 165–174. — PMID: 17468957
- [57] ECHEVARRIA, M ; WINDHAGER, E E ; TATE, S S ; FRINDT, G: Cloning and expression of AQP3, a water channel from the medullary collecting duct of rat kidney. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* Bd. 91 (1994), Nr. 23, S. 10997–11001. — PMID: 7526388 PMCID: PMC45153
- [58] EISNER, CHRISTOPH ; FAULHABER-WALTER, ROBERT ; WANG, YAOHUI ; LEELAHAVANICHKUL, ASADA ; YUEN, PETER S T ; MIZEL, DIANE ; STAR, ROBERT A ; BRIGGS, JOSEPHINE P ; LEVINE, MARK ; U. A.: Major contribution of tubular secretion to creatinine clearance in mice. In: *Kidney international* Bd. 77 (2010), Nr. 6, S. 519–526. — PMID: 20032962 PMCID: PMC3160625
- [59] EL-FARHAN, NADIA ; HAMPTON, DAVID ; PENNEY, MICHAEL: Measurement of arginine vasopressin. In: *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* Bd. 1065 (2013), S. 129–139. — PMID: 23996361
- [60] ELLISON, DAVID H ; BERL, TOMAS: Clinical practice. The syndrome of inappropriate antidiuresis. In: *The New England journal of medicine* Bd. 356 (2007), Nr. 20, S. 2064–2072. — PMID: 17507705
- [61] EPSTEIN, MURRAY ; CALHOUN, DAVID A: Aldosterone blockers (mineralocorticoid receptor antagonism) and potassium-sparing diuretics. In: *Journal of clinical hypertension (Greenwich, Conn.)* Bd. 13 (2011), Nr. 9, S. 644–648. — PMID: 21896143
- [62] ESPOSITO, PASQUALE ; PIOTTI, GIOVANNI ; BIANZINA, STEFANIA ; MALUL, YEHUDA ; DAL CANTON, ANTONIO: The Syndrome of Inappropriate Antidiuresis: Pathophysiology, Clinical Management and New Therapeutic Options. In: *Nephron Clinical Practice* Bd. 119 (2011), Nr. 1, S. c62–c73

-
- [63] ESTÉVEZ, R ; BOETTGER, T ; STEIN, V ; BIRKENHÄGER, R ; OTTO, E ; HILDEBRANDT, F ; JENTSCH, T J: Barttin is a Cl⁻ channel beta-subunit crucial for renal Cl⁻ reabsorption and inner ear K⁺ secretion. In: *Nature* Bd. 414 (2001), Nr. 6863, S. 558–561. — PMID: 11734858
 - [64] FENTON, ROBERT A. ; MOELLER, HANNE B. ; HOFFERT, JASON D. ; YU, MING-JIUN ; NIELSEN, S?REN ; KNEPPER, MARK A.: Acute regulation of aquaporin-2 phosphorylation at Ser-264 by vasopressin. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* Bd. 105 (2008), Nr. 8, S. 3134–3139. — PMID: 18287043PMCID: PMC2268597
 - [65] FORSSMANN, W G ; RICHTER, R ; MEYER, M: The endocrine heart and natriuretic peptides: histochemistry, cell biology, and functional aspects of the renal urodilatin system. In: *Histochemistry and cell biology* Bd. 110 (1998), Nr. 4, S. 335–357. — PMID: 9792413
 - [66] FORSSMANN, W ; MEYER, M ; FORSSMANN, K: The renal urodilatin system: clinical implications. In: *Cardiovascular research* Bd. 51 (2001), Nr. 3, S. 450–462. — PMID: 11476735
 - [67] FORTE, L R ; LONDON, R M ; FREEMAN, R H ; KRAUSE, W J: Guanylin peptides: renal actions mediated by cyclic GMP. In: *American journal of physiology. Renal physiology* Bd. 278 (2000), Nr. 2, S. F180–191. — PMID: 10662722
 - [68] FRANK, ELISABETH ; LANDGRAF, RAINER: The vasopressin system--from antidiuresis to psychopathology. In: *European journal of pharmacology* Bd. 583 (2008), Nr. 2-3, S. 226–242. — PMID: 18275951
 - [69] FRENCH, P J ; BIJMAN, J ; EDIXHOVEN, M ; VAANDRAGER, A B ; SCHOLTE, B J ; LOHMANN, S M ; NAIRN, A C ; DE JONGE, H R: Isozyme-specific activation of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator-chloride channels by cGMP-dependent protein kinase II. In: *The Journal of biological chemistry* Bd. 270 (1995), Nr. 44, S. 26626–26631. — PMID: 7592887
 - [70] FRINDT, GUSTAVO ; ERGONUL, ZUHAL ; PALMER, LAWRENCE G: Na channel expression and activity in the medullary collecting duct of rat kidney. In: *American journal of physiology. Renal physiology* Bd. 292 (2007), Nr. 4, S. F1190–1196. — PMID: 17200158
 - [71] FULLER, F ; PORTER, J G ; ARFSTEN, A E ; MILLER, J ; SCHILLING, J W ; SCARBOROUGH, R M ; LEWICKI, J A ; SCHENK, D B: Atrial natriuretic peptide clearance receptor. Complete sequence and functional expression of cDNA clones. In: *The Journal of biological chemistry* Bd. 263 (1988), Nr. 19, S. 9395–9401. — PMID: 2837487
 - [72] FUSHIMI, K ; SASAKI, S ; MARUMO, F: Phosphorylation of serine 256 is required for cAMP-dependent regulatory exocytosis of the aquaporin-2 water channel. In: *The Journal of biological chemistry* Bd. 272 (1997), Nr. 23, S. 14800–14804. — PMID: 9169447
 - [73] GAGELMANN, M ; HOCK, D ; FORSSMANN, W G: Urodilatin (CDD/ANP-95-126) is not biologically inactivated by a peptidase from dog kidney cortex membranes in contrast to atrial natriuretic peptide/cardioidilatin (alpha-hANP/CDD-99-126). In: *FEBS letters* Bd. 233 (1988), Nr. 2, S. 249–254. — PMID: 2968281
 - [74] GAMBARYAN, S ; HÄUSLER, C ; MARKERT, T ; PÖHLER, D ; JARCHAU, T ; WALTER, U ; HAASE, W ; KURTZ, A ; LOHMANN, S M: Expression of type II cGMP-dependent protein kinase in rat kidney is regulated by dehydration and correlated with renin gene expression. In: *The Journal of clinical investigation* Bd. 98 (1996), Nr. 3, S. 662–670. — PMID: 8698857 PMCID: PMC507475
 - [75] GAMBARYAN, STEPAN ; BUTT, ELKE ; MARCUS, KATRIN ; GLAZOVA, MARGARITA ; PALMETSHOFER, ALOIS ; GUILLON, GILLES ; SMOLENSKI, ALBERT: cGMP-dependent protein kinase type II regulates basal level of aldosterone production by zona glomerulosa cells without increasing expression of the steroidogenic acute regulatory protein gene. In: *The Journal of biological chemistry* Bd. 278 (2003), Nr. 32, S. 29640–29648. — PMID: 12775716
 - [76] GAMM, DAVID M. ; FRANCIS, SHARRON H. ; ANGELOTTI, TIMOTHY P. ; CORBIN, JACKIE D. ; UHLER, MICHAEL D.: The Type II Isoform of cGMP-dependent Protein Kinase Is Dimeric and Possesses Regulatory and Catalytic Properties Distinct from the Type I Isoforms. In: *Journal of Biological Chemistry* Bd. 270 (1995), Nr. 45, S. 27380–27388. — PMID: 7593002
 - [77] GARCÍA, ANA M ; REDONDO, MIRIAM ; MARTINEZ, ANA ; GIL, CARMEN: Phosphodiesterase 10 Inhibitors: New Disease Modifying Drugs for Parkinson's Disease? In: *Current medicinal chemistry* (2013). — PMID: 24372206

- [78] GARTY, H ; PALMER, L G: Epithelial sodium channels: function, structure, and regulation. In: *Physiological reviews* Bd. 77 (1997), Nr. 2, S. 359–396. — PMID: 9114818
- [79] GHOFrani, Hossein-Ardeschir ; GALIÈ, NAZZARENO ; GRIMMINGER, FRIEDRICH ; GRÜNIG, EKKEHARD ; HUMBERT, MARC ; JING, ZHI-CHENG ; KEOGH, ANNE M ; LANGLEBEN, DAVID ; KILAMA, MICHAEL OCHAN ; U. A.: Riociguat for the treatment of pulmonary arterial hypertension. In: *The New England journal of medicine* Bd. 369 (2013), Nr. 4, S. 330–340. — PMID: 23883378
- [80] GILL, RAVINDER K ; SAKSENA, SEEMA ; SYED, IRFAN ALI ; TYAGI, SANGEETA ; ALREFAI, WADDAH A ; MALAKOOTI, JALEH ; RAMASWAMY, KRISHNAMURTHY ; DUDEJA, PRADEEP K: Regulation of NHE3 by nitric oxide in Caco-2 cells. In: *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology* Bd. 283 (2002), Nr. 3, S. G747–756. — PMID: 12181191
- [81] GIORDANO, DANIELA ; DE STEFANO, MARIA EGLE ; CITRO, GENNARO ; MODICA, ANNA ; GIORGI, MAURO: Expression of cGMP-binding cGMP-specific phosphodiesterase (PDE5) in mouse tissues and cell lines using an antibody against the enzyme amino-terminal domain. In: *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* Bd. 1539 (2001), Nr. 1–2, S. 16–27
- [82] GOLIN-BISELLO, FRANCA ; BRADBURY, NEIL ; AMEEN, NADIA: STa and cGMP stimulate CFTR translocation to the surface of villus enterocytes in rat jejunum and is regulated by protein kinase G. In: *American journal of physiology. Cell physiology* Bd. 289 (2005), Nr. 3, S. C708–716. — PMID: 15872007
- [83] GOOD, D W ; DI MARI, J F ; WATTS, B A, 3RD: Hyposmolality stimulates Na(+)/H(+) exchange and HCO(3)(-) absorption in thick ascending limb via PI 3-kinase. In: *American journal of physiology. Cell physiology* Bd. 279 (2000), Nr. 5, S. C1443–1454. — PMID: 11029292
- [84] GREENBERG, A: Diuretic complications. In: *The American journal of the medical sciences* Bd. 319 (2000), Nr. 1, S. 10–24. — PMID: 10653441
- [85] GRÜNFELD, JEAN-PIERRE ; ROSSIER, BERNARD C: Lithium nephrotoxicity revisited. In: *Nature reviews. Nephrology* Bd. 5 (2009), Nr. 5, S. 270–276. — PMID: 19384328
- [86] GUO, LAI-JING ; ALLI, ABDEL A ; EATON, DOUGLAS C ; BAO, HUI-FANG: ENaC is regulated by natriuretic peptide receptor-dependent cGMP signaling. In: *American journal of physiology. Renal physiology* Bd. 304 (2013), Nr. 7, S. F930–937. — PMID: 23324181
- [87] HACKENTHAL, E. ; PAUL, M. ; GANTEN, D. ; TAUGNER, R.: Morphology, physiology, and molecular biology of renin secretion. In: *Physiological Reviews* Bd. 70 (1990), Nr. 4, S. 1067–1116. — PMID: 2217555
- [88] HALPERIN, M L ; KAMEL, K S: Potassium. In: *Lancet* Bd. 352 (1998), Nr. 9122, S. 135–140. — PMID: 9672294
- [89] HAMMELMANN, VERENA ; ZONG, XIANGANG ; HOFMANN, FRANZ ; MICHALAKIS, STYLIANOS ; BIEL, MARTIN: The cGMP-dependent protein kinase II Is an inhibitory modulator of the hyperpolarization-activated HCN2 channel. In: *PloS one* Bd. 6 (2011), Nr. 2, S. e17078. — PMID: 21347269 PMCID: PMC3038938
- [90] HANAHAN, D: Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids. In: *Journal of molecular biology* Bd. 166 (1983), Nr. 4, S. 557–580. — PMID: 6345791
- [91] HANSSON, J H ; NELSON-WILLIAMS, C ; SUZUKI, H ; SCHILD, L ; SHIMKETS, R ; LU, Y ; CANESSA, C ; IWASAKI, T ; ROSSIER, B ; U. A.: Hypertension caused by a truncated epithelial sodium channel gamma subunit: genetic heterogeneity of Liddle syndrome. In: *Nature genetics* Bd. 11 (1995), Nr. 1, S. 76–82. — PMID: 7550319
- [92] HARSHFIELD, GREGORY A ; DONG, YANBIN ; KAPUKU, GASTON K ; ZHU, HAIDONG ; HANEVOLD, CORAL D: Stress-induced sodium retention and hypertension: a review and hypothesis. In: *Current hypertension reports* Bd. 11 (2009), Nr. 1, S. 29–34. — PMID: 19146798
- [93] HEBERT, S C ; ANDREOLI, T E: Ionic conductance pathways in the mouse medullary thick ascending limb of Henle. The paracellular pathway and electrogenic Cl- absorption. In: *The Journal of general physiology* Bd. 87 (1986), Nr. 4, S. 567–590. — PMID: 3701299 PMCID: PMC2215874
- [94] HENRICH, W L ; MCALLISTER, E A ; SMITH, P B ; CAMPBELL, W B: Guanosine 3',5'-cyclic monophosphate as a mediator of inhibition of renin release. In: *The American journal of physiology* Bd. 255 (1988), Nr. 3 Pt 2, S. F474–478. — PMID: 2901230
- [95] HOFFERT, JASON D ; FENTON, ROBERT A ; MOELLER, HANNE B ; SIMONS, BRIGITTE ; TCHAPYJNIKOV, DMITRY ; MCDILL, BRADLEY W ; YU, MING-JIUN ; PISITKUN, TRAIRAK ; CHEN,

- FENG ; U. A.: Vasopressin-stimulated increase in phosphorylation at Ser269 potentiates plasma membrane retention of aquaporin-2. In: *The Journal of biological chemistry* Bd. 283 (2008), Nr. 36, S. 24617–24627. — PMID: 18606813 PMCID: PMC2528999
- [96] HOFFERT, JASON D ; NIELSEN, JAKOB ; YU, MING-JIUN ; PISITKUN, TRAIRAK ; SCHLEICHER, STEPHEN M ; NIELSEN, SOREN ; KNEPPER, MARK A: Dynamics of aquaporin-2 serine-261 phosphorylation in response to short-term vasopressin treatment in collecting duct. In: *American journal of physiology. Renal physiology* Bd. 292 (2007), Nr. 2, S. F691–700. — PMID: 16985212
- [97] HOFFERT, JASON D ; PISITKUN, TRAIRAK ; WANG, GUANGHUI ; SHEN, RONG-FONG ; KNEPPER, MARK A: Quantitative phosphoproteomics of vasopressin-sensitive renal cells: regulation of aquaporin-2 phosphorylation at two sites. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* Bd. 103 (2006), Nr. 18, S. 7159–7164. — PMID: 16641100 PMCID: PMC1459033
- [98] HOFMANN, FRANZ ; WEGENER, JÖRG W: cGMP-dependent protein kinases (cGK). In: *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* Bd. 1020 (2013), S. 17–50. — PMID: 23709024
- [99] HOORN, EWOUT J ; ZIETSE, ROBERT: Hyponatremia revisited: translating physiology to practice. In: *Nephron. Physiology* Bd. 108 (2008), Nr. 3, S. p46–59. — PMID: 18319606
- [100] HUANG, DAN YANG ; BOINI, KRISHNA M ; LANG, PHILIPP A ; GRAHAMMER, FLORIAN ; DUSZENKO, MICHAEL ; HELLER-STILB, BIRGIT ; WARSKULAT, ULRICH ; HÄUSSINGER, DIETER ; LANG, FLORIAN ; U. A.: Impaired ability to increase water excretion in mice lacking the taurine transporter gene TAUT. In: *Pflügers Archiv: European journal of physiology* Bd. 451 (2006), Nr. 5, S. 668–677. — PMID: 16249932
- [101] HUNT, THOMAS ; ATHERTON-WATSON, HAZEL C ; AXFORD, JAKE ; COLLINGWOOD, STEPHEN P ; COOTE, KEVIN J ; COX, BRIAN ; CZARNECKI, SARAH ; DANAHAY, HENRY ; DEVEREUX, NICK ; U. A.: Discovery of a novel chemotype of potent human ENaC blockers using a bioisostere approach. Part 1: quaternary amines. In: *Bioorganic & medicinal chemistry letters* Bd. 22 (2012), Nr. 2, S. 929–932. — PMID: 22197144
- [102] HUNT, THOMAS ; ATHERTON-WATSON, HAZEL C ; COLLINGWOOD, STEPHEN P ; COOTE, KEVIN J ; CZARNECKI, SARAH ; DANAHAY, HENRY ; HOWSHAM, CATHERINE ; HUNT, PETER ; PAISLEY, DEREK ; U. A.: Discovery of a novel chemotype of potent human ENaC blockers using a bioisostere approach. Part 2: α -Branched quaternary amines. In: *Bioorganic & medicinal chemistry letters* Bd. 22 (2012), Nr. 8, S. 2877–2879. — PMID: 22425452
- [103] EL-HUSSEINI, A E ; BLADEN, C ; VINCENT, S R: Molecular characterization of a type II cyclic GMP-dependent protein kinase expressed in the rat brain. In: *Journal of neurochemistry* Bd. 64 (1995), Nr. 6, S. 2814–2817. — PMID: 7760063
- [104] ISHIBASHI, K ; SASAKI, S ; FUSHIMI, K ; UCHIDA, S ; KUWAHARA, M ; SAITO, H ; FURUKAWA, T ; NAKAJIMA, K ; YAMAGUCHI, Y ; U. A.: Molecular cloning and expression of a member of the aquaporin family with permeability to glycerol and urea in addition to water expressed at the basolateral membrane of kidney collecting duct cells. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* Bd. 91 (1994), Nr. 14, S. 6269–6273. — PMID: 7517548 PMCID: PMC44182
- [105] JAFFEY, L ; MARTIN, A: Malignant hyperkalaemia after amiloride/hydrochlorothiazide treatment. In: *Lancet* Bd. 1 (1981), Nr. 8232, S. 1272. — PMID: 6112601
- [106] JARCHAU, T ; HAUSLER, C ; MARKERT, T ; POHLER, D ; VANDERKERCKHOVE, J ; DE JONGE, H R ; LOHMANN, S M ; WALTER, U: Cloning, expression, and in situ localization of rat intestinal cGMP-dependent protein kinase II. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* Bd. 91 (1994), Nr. 20, S. 9426–9430. — PMID: 7937783 PMCID: PMC44825
- [107] JENSEN, K T ; CARSTENS, J ; PEDERSEN, E B: Effect of BNP on renal hemodynamics, tubular function and vasoactive hormones in humans. In: *The American journal of physiology* Bd. 274 (1998), Nr. 1 Pt 2, S. F63–72. — PMID: 9458824
- [108] JIN, XIAO-HONG ; MCGRATH, HELEN E ; GILDEA, JOHN J ; SIRAGY, HELMY M ; FELDER, ROBIN A ; CAREY, ROBERT M: Renal interstitial guanosine cyclic 3', 5'-monophosphate mediates pressure-natriuresis via protein kinase G. In: *Hypertension* Bd. 43 (2004), Nr. 5, S. 1133–1139. — PMID: 15007031
- [109] JOHNS, EDWARD J ; KOPP, ULLA C ; DiBONA, GERALD F: Neural control of renal function. In: *Comprehensive Physiology* Bd. 1 (2011), Nr. 2, S. 731–767. — PMID: 23737201

-
- [110] KAJIMOTO, KATSUYA ; SHAO, DAN ; TAKAGI, HIROMITSU ; MACERI, GREGORIO ; ZABLOCKI, DANIELA ; MUKAI, HIDEYUKI ; ONO, YOSHITAKA ; SADOSHIMA, JUNICHI: Hypotonic swelling-induced activation of PKN1 mediates cell survival in cardiac myocytes. In: *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* Bd. 300 (2011), Nr. 1, S. H191–200. — PMID: 21037231 PMCID: PMC3023260
 - [111] KAMPMANN, J P ; HANSEN, J M: Glomerular filtration rate and creatinine clearance. In: *British journal of clinical pharmacology* Bd. 12 (1981), Nr. 1, S. 7–14. — PMID: 6788057 PMCID: PMC1401744
 - [112] KANGAWA, K ; FUKUDA, A ; KUBOTA, I ; HAYASHI, Y ; MATSUO, H: Identification in rat atrial tissue of multiple forms of natriuretic polypeptides of about 3,000 daltons. In: *Biochemical and biophysical research communications* Bd. 121 (1984), Nr. 2, S. 585–591. — PMID: 6539598
 - [113] KASHLAN, OSSAMA B. ; KLEYMAN, THOMAS R.: ENaC structure and function in the wake of a resolved structure of a family member. In: *American Journal of Physiology - Renal Physiology* Bd. 301 (2011), Nr. 4, S. F684–F696. — PMID: 21753073 PMCID: PMC3191808
 - [114] KELLENBERGER, STEPHAN ; GAUTSCHI, IVAN ; SCHILD, LAURENT: Mutations in the epithelial Na⁺ channel ENaC outer pore disrupt amiloride block by increasing its dissociation rate. In: *Molecular pharmacology* Bd. 64 (2003), Nr. 4, S. 848–856. — PMID: 14500741
 - [115] KELLENBERGER, STEPHAN ; SCHILD, LAURENT: Epithelial sodium channel/degenerin family of ion channels: a variety of functions for a shared structure. In: *Physiological reviews* Bd. 82 (2002), Nr. 3, S. 735–767. — PMID: 12087134
 - [116] KIM, J K ; SUMMER, S N ; DURR, J ; SCHRIER, R W: Enzymatic and binding effects of atrial natriuretic factor in glomeruli and nephrons. In: *Kidney international* Bd. 35 (1989), Nr. 3, S. 799–805. — PMID: 2540377
 - [117] KIM, JEONG JOO ; CASTEEL, DARREN E ; HUANG, GILBERT ; KWON, TAEK HUN ; REN, RONNIE KUO ; ZWART, PETER ; HEADD, JEFFREY J ; BROWN, NICHOLAS GENE ; CHOW, DAR-CHONE ; U. A.: Co-crystal structures of PKG I β (92-227) with cGMP and cAMP reveal the molecular details of cyclic-nucleotide binding. In: *PloS one* Bd. 6 (2011), Nr. 4, S. e18413. — PMID: 21526164 PMCID: PMC3080414
 - [118] KITA, T ; SMITH, C E ; FOK, K F ; DUFFIN, K L ; MOORE, W M ; KARABATSOS, P J ; KACHUR, J F ; HAMRA, F K ; PIDHORODECKYJ, N V ; U. A.: Characterization of human uroguanylin: a member of the guanylin peptide family. In: *The American journal of physiology* Bd. 266 (1994), Nr. 2 Pt 2, S. F342–348. — PMID: 8141334
 - [119] KLOKKERS, JENS ; LANGEHANENBERG, PATRIK ; KEMPER, BJÖRN ; KOSMEIER, SEBASTIAN ; VON BALLY, GERT ; RIETHMÜLLER, CHRISTOPH ; WUNDER, FRANK ; SINDIC, ALEKSANDRA ; PAVENSTÄDT, HERMANN ; U. A.: Atrial natriuretic peptide and nitric oxide signaling antagonizes vasopressin-mediated water permeability in inner medullary collecting duct cells. In: *American journal of physiology. Renal physiology* Bd. 297 (2009), Nr. 3, S. F693–703. — PMID: 19570884
 - [120] KLUSSMANN, E ; ROSENTHAL, W: Role and identification of protein kinase A anchoring proteins in vasopressin-mediated aquaporin-2 translocation. In: *Kidney international* Bd. 60 (2001), Nr. 2, S. 446–449. — PMID: 11473624
 - [121] KNEPPER, M A: Measurement of osmolality in kidney slices using vapor pressure osmometry. In: *Kidney international* Bd. 21 (1982), Nr. 4, S. 653–655. — PMID: 7098276
 - [122] KNEPPER, M A ; NIELSEN, S: Kinetic model of water and urea permeability regulation by vasopressin in collecting duct. In: *The American journal of physiology* Bd. 265 (1993), Nr. 2 Pt 2, S. F214–224. — PMID: 8396343
 - [123] KOLLA, V ; LITWACK, G: Transcriptional regulation of the human Na/K ATPase via the human mineralocorticoid receptor. In: *Molecular and cellular biochemistry* Bd. 204 (2000), Nr. 1-2, S. 35–40. — PMID: 10718622
 - [124] KORTENOEVEN, MARLEEN L A ; LI, YUEDAN ; SHAW, STEPHEN ; GAEGGELER, HANS-PETER ; ROSSIER, BERNARD C ; WETZELS, JACK F M ; DEEN, PETER M T: Amiloride blocks lithium entry through the sodium channel thereby attenuating the resultant nephrogenic diabetes insipidus. In: *Kidney international* Bd. 76 (2009), Nr. 1, S. 44–53. — PMID: 19367330
 - [125] KORTENOEVEN, MARLEEN L. A. ; FENTON, ROBERT A.: Renal aquaporins and water balance disorders. In: *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*

-
- [126] KOSEKI, C ; HAYASHI, Y ; TORIKAI, S ; FURUYA, M ; OHNUMA, N ; IMAI, M: Localization of binding sites for alpha-rat atrial natriuretic polypeptide in rat kidney. In: *The American journal of physiology* Bd. 250 (1986), Nr. 2 Pt 2, S. F210–216. — PMID: 3004229
 - [127] KOSTAKIS, IOANNIS D ; CHOLIDOU, KYRIAKI G ; PERREA, DESPINA: Syndromes of impaired ion handling in the distal nephron: pseudohypoaldosteronism and familial hyperkalemic hypertension. In: *Hormones (Athens, Greece)* Bd. 11 (2012), Nr. 1, S. 31–53. — PMID: 22450343
 - [128] KRANE, CARISSA M ; GOLDSTEIN, DAVID L: Comparative functional analysis of aquaporins/glyceroporins in mammals and anurans. In: *Mammalian genome: official journal of the International Mammalian Genome Society* Bd. 18 (2007), Nr. 6-7, S. 452–462. — PMID: 17653793 PMCID: PMC1998877
 - [129] KUHN, MICHAELA: Cardiac and intestinal natriuretic peptides: insights from genetically modified mice. In: *Peptides* Bd. 26 (2005), Nr. 6, S. 1078–1085. — PMID: 15911075
 - [130] KURTZ, A ; GÖTZ, K H ; HAMANN, M ; WAGNER, C: Stimulation of renin secretion by nitric oxide is mediated by phosphodiesterase 3. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* Bd. 95 (1998), Nr. 8, S. 4743–4747. — PMID: 9539809 PMCID: PMC22561
 - [131] KUWAHARA, M ; FUSHIMI, K ; TERADA, Y ; BAI, L ; MARUMO, F ; SASAKI, S: cAMP-dependent phosphorylation stimulates water permeability of aquaporin-collecting duct water channel protein expressed in *Xenopus* oocytes. In: *The Journal of biological chemistry* Bd. 270 (1995), Nr. 18, S. 10384–10387. — PMID: 7537730
 - [132] KYHSE-ANDERSEN, J: Electrophoretic transfer of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. In: *Journal of biochemical and biophysical methods* Bd. 10 (1984), Nr. 3-4, S. 203–209. — PMID: 6530509
 - [133] LAEMMLI, U K: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. In: *Nature* Bd. 227 (1970), Nr. 5259, S. 680–685. — PMID: 5432063
 - [134] LAKICS, VIKTOR ; KARRAN, ERIC H ; BOESS, FRANK G: Quantitative comparison of phosphodiesterase mRNA distribution in human brain and peripheral tissues. In: *Neuropharmacology* Bd. 59 (2010), Nr. 6, S. 367–374. — PMID: 20493887
 - [135] LAM, K S ; WAT, M S ; CHOI, K L ; IP, T P ; PANG, R W ; KUMANA, C R: Pharmacokinetics, pharmacodynamics, long-term efficacy and safety of oral 1-deamino-8-D-arginine vasopressin in adult patients with central diabetes insipidus. In: *British journal of clinical pharmacology* Bd. 42 (1996), Nr. 3, S. 379–385. — PMID: 8877030 PMCID: PMC2042683
 - [136] LANDGRAF, W ; HOFMANN, F ; PELTON, J T ; HUGGINS, J P: Effects of cyclic GMP on the secondary structure of cyclic GMP dependent protein kinase and analysis of the enzyme's amino-terminal domain by far-ultraviolet circular dichroism. In: *Biochemistry* Bd. 29 (1990), Nr. 42, S. 9921–9928. — PMID: 2176858
 - [137] LESSA, LUCÍLIA M A ; CARRARO-LACROIX, LUCIENE R ; CRAJOINAS, RENATO O ; BEZERRA, CAMILA N ; DARIOLLI, RAFAEL ; GIRARDI, ADRIANA C C ; FONTELES, MANASSÉS C ; MALNIC, GERHARD: Mechanisms underlying the inhibitory effects of uroguanylin on NHE3 transport activity in renal proximal tubule. In: *American journal of physiology. Renal physiology* Bd. 303 (2012), Nr. 10, S. F1399–1408. — PMID: 22952280
 - [138] LEWKO, BARBARA ; ENDLICH, NICOLE ; KRIZ, WILHELM ; STEPINSKI, JAN ; ENDLICH, KARLHANS: C-type natriuretic peptide as a podocyte hormone and modulation of its cGMP production by glucose and mechanical stress. In: *Kidney international* Bd. 66 (2004), Nr. 3, S. 1001–1008. — PMID: 15327393
 - [139] LI, C ; WANG, W ; KWON, T H ; ISIKAY, L ; WEN, J G ; MARPLES, D ; DJURHUUS, J C ; STOCKWELL, A ; KNEPPER, M A ; U. A.: Downregulation of AQP1, -2, and -3 after ureteral obstruction is associated with a long-term urine-concentrating defect. In: *American journal of physiology. Renal physiology* Bd. 281 (2001), Nr. 1, S. F163–171. — PMID: 11399657
 - [140] LIDDLE, GW ; BLEDSOE, T ; COPPAGE, WS: A familial renal disorder simulating primary aldosteronism but with negligible aldosterone secretion (1963), Nr. 76, S. 199–213
 - [141] LOFFING, JOHANNES ; SCHILD, LAURENT: Functional domains of the epithelial sodium channel. In: *Journal of the American Society of Nephrology: JASN* Bd. 16 (2005), Nr. 11, S. 3175–3181. — PMID: 16192417
 - [142] LU, HUA A J ; SUN, TIAN-XIAO ; MATSUZAKI, TOSHIYUKI ; YI, XIAN-HUA ; ESWARA, JAIRAM ; BOULEY, RICHARD ; MCKEE, MARY ; BROWN, DENNIS: Heat shock protein 70 interacts with

- aquaporin-2 and regulates its trafficking. In: *The Journal of biological chemistry* Bd. 282 (2007), Nr. 39, S. 28721–28732. — PMID: 17636261
- [143] LU, MIN ; ECHEVERRI, FERNANDO ; KALABAT, DALIA ; LAITA, BIANCA ; DAHAN, DAVID S ; SMITH, RAYMOND D ; XU, HONG ; STASZEWSKI, LENA ; YAMAMOTO, JEFF ; U. A.: Small molecule activator of the human epithelial sodium channel. In: *The Journal of biological chemistry* Bd. 283 (2008), Nr. 18, S. 11981–11994. — PMID: 18326490
- [144] MARATHE, NISHA ; RANGASWAMI, HEMA ; ZHUANG, SHUNHUI ; BOSS, GERRY R ; PILZ, RENATE B: Pro-survival effects of 17 β -estradiol on osteocytes are mediated by nitric oxide/cGMP via differential actions of cGMP-dependent protein kinases I and II. In: *The Journal of biological chemistry* Bd. 287 (2012), Nr. 2, S. 978–988. — PMID: 22117068 PMCID: PMC3256896
- [145] MARPLES, D ; KNEPPER, M A ; CHRISTENSEN, E I ; NIELSEN, S: Redistribution of aquaporin-2 water channels induced by vasopressin in rat kidney inner medullary collecting duct. In: *The American journal of physiology* Bd. 269 (1995), Nr. 3 Pt 1, S. C655–664. — PMID: 7573395
- [146] MARUNAKA, YOSHINORI ; NIISATO, NAOMI ; TARUNO, AKIYUKI ; OHTA, MARIKO ; MIYAZAKI, HIROAKI ; HOSOGI, SHIGEKUNI ; NAKAJIMA, KEN-ICHI ; KUSUZAKI, KATSUYUKI ; ASHIHARA, EISHI ; U. A.: Regulation of epithelial sodium transport via epithelial Na⁺ channel. In: *Journal of biomedicine & biotechnology* Bd. 2011 (2011), S. 978196. — PMID: 22028593 PMCID: PMC3196915
- [147] MASILAMANI, S ; KIM, G H ; MITCHELL, C ; WADE, J B ; KNEPPER, M A: Aldosterone-mediated regulation of ENaC alpha, beta, and gamma subunit proteins in rat kidney. In: *The Journal of clinical investigation* Bd. 104 (1999), Nr. 7, S. R19–23. — PMID: 10510339 PMCID: PMC408561
- [148] MATSUKAWA, TOSHIYOSHI ; MIYAMOTO, TAKENORI: Angiotensin II-stimulated secretion of arginine vasopressin is inhibited by atrial natriuretic peptide in humans. In: *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology* Bd. 300 (2011), Nr. 3, S. R624–629. — PMID: 21123762
- [149] MENETON, P ; ICHIKAWA, I ; INAGAMI, T ; SCHNERMANN, J: Renal physiology of the mouse. In: *American journal of physiology. Renal physiology* Bd. 278 (2000), Nr. 3, S. F339–351. — PMID: 10710537
- [150] MEYER, M ; RICHTER, R ; BRUNKHORST, R ; WRENGER, E ; SCHULZ-KNAPPE, P ; KIST, A ; MENTZ, P ; BRABANT, E G ; KOCH, K M ; U. A.: Urodilatin is involved in sodium homeostasis and exerts sodium-state-dependent natriuretic and diuretic effects. In: *The American journal of physiology* Bd. 271 (1996), Nr. 3 Pt 2, S. F489–497. — PMID: 8853410
- [151] MICHLIG, STÉPHANIE ; HARRIS, MICHAEL ; LOFFING, JOHANNES ; ROSSIER, BERNARD C ; FIRSOV, DMITRI: Progesterone down-regulates the open probability of the amiloride-sensitive epithelial sodium channel via a Nedd4-2-dependent mechanism. In: *The Journal of biological chemistry* Bd. 280 (2005), Nr. 46, S. 38264–38270. — PMID: 16172119
- [152] MOELLER, HANNE B ; KNEPPER, MARK A ; FENTON, ROBERT A: Serine 269 phosphorylated aquaporin-2 is targeted to the apical membrane of collecting duct principal cells. In: *Kidney international* Bd. 75 (2009), Nr. 3, S. 295–303. — PMID: 18843259 PMCID: PMC3502047
- [153] MOELLER, HANNE B. ; PRAETORIUS, JEPPE ; RÜTZLER, MICHAEL R. ; FENTON, ROBERT A.: Phosphorylation of aquaporin-2 regulates its endocytosis and protein–protein interactions. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* Bd. 107 (2010), Nr. 1, S. 424–429. — PMID: 19966308
- [154] MORELLO, J P ; SALAHPOUR, A ; LAPERRIÈRE, A ; BERNIER, V ; ARTHUS, M F ; LONERGAN, M ; PETÄJÄ-REPO, U ; ANGERS, S ; MORIN, D ; U. A.: Pharmacological chaperones rescue cell-surface expression and function of misfolded V2 vasopressin receptor mutants. In: *The Journal of clinical investigation* Bd. 105 (2000), Nr. 7, S. 887–895. — PMID: 10749568 PMCID: PMC377482
- [155] MULDER, S M ; BICHET, D G ; RIJSS, J P ; KAMSTEEG, E J ; ARTHUS, M F ; LONERGAN, M ; FUJIWARA, M ; MORGAN, K ; LEIJENDEKKER, R ; U. A.: An aquaporin-2 water channel mutant which causes autosomal dominant nephrogenic diabetes insipidus is retained in the Golgi complex. In: *The Journal of clinical investigation* Bd. 102 (1998), Nr. 1, S. 57–66. — PMID: 9649557 PMCID: PMC509065
- [156] MURTAZINA, RAKHILYA ; KOVBASNJUK, OLGA ; CHEN, TIAN-E. ; ZACHOS, NICHOLAS C. ; CHEN, YEUPING ; KOCINSKY, HETAL S. ; HOGEMA, BORIS M. ; SEIDLER, URSULA ; DE JONGE, HUGO R.

-
- ; U. A.: NHERF2 is necessary for basal activity, second messenger inhibition, and LPA stimulation of NHE3 in mouse distal ileum. In: *American Journal of Physiology - Cell Physiology* Bd. 301 (2011), Nr. 1, S. C126–C136. — PMID: 21430287
- [157] NEANT, F ; BAILLY, C: Luminal and intracellular cGMP inhibit the mTAL reabsorptive capacity through different pathways. In: *Kidney international* Bd. 44 (1993), Nr. 4, S. 741–746. — PMID: 8258951
- [158] NEDVETSKY, PAVEL I ; TAMMA, GRAZIA ; BEULSHAUSEN, SVEN ; VALENTI, GIOVANNA ; ROSENTHAL, WALTER ; KLUSSMANN, ENNO: Regulation of aquaporin-2 trafficking. In: *Handbook of experimental pharmacology* (2009), Nr. 190, S. 133–157. — PMID: 19096775
- [159] NEUBAUER, BJÖRN ; MACHURA, KATHARINA ; KETTL, RAMONA ; LOPEZ, MARIA LUISA S. SEQUEIRA ; FRIEBE, ANDREAS ; KURTZ, ARMIN: Endothelium-Derived Nitric Oxide Supports Renin Cell Recruitment Through the Nitric Oxide–Sensitive Guanylate Cyclase Pathway. In: *Hypertension* Bd. 61 (2013), Nr. 2, S. 400–407. — PMID: 23297374
- [160] NIE, HONG-GUANG ; CHEN, LAN ; HAN, DONG-YUN ; LI, JUN ; SONG, WEI-FENG ; WEI, SHI-PENG ; FANG, XIAO-HUI ; GU, XIU ; MATALON, SADIS ; U. A.: Regulation of epithelial sodium channels by cGMP/PKGII. In: *The Journal of physiology* Bd. 587 (2009), Nr. Pt 11, S. 2663–2676. — PMID: 19359370 PMCID: PMC2714029
- [161] NIELSEN, SØREN ; FRØKIAER, JØRGEN ; MARPLES, DAVID ; KWON, TAE-HWAN ; AGRE, PETER ; KNEPPER, MARK A: Aquaporins in the kidney: from molecules to medicine. In: *Physiological reviews* Bd. 82 (2002), Nr. 1, S. 205–244. — PMID: 11773613
- [162] NIISATO, N ; VAN DRIESSCHE, W ; LIU, M ; MARUNAKA, Y: Involvement of protein tyrosine kinase in osmoregulation of Na(+) transport and membrane capacitance in renal A6 cells. In: *The Journal of membrane biology* Bd. 175 (2000), Nr. 1, S. 63–77. — PMID: 10811968
- [163] NIISATO, N ; MARUNAKA, Y: Activation of the Na⁺-K⁺ pump by hyposmolality through tyrosine kinase-dependent Cl⁻ conductance in *Xenopus* renal epithelial A6 cells. In: *The Journal of physiology* Bd. 518 (Pt 2) (1999), S. 417–432. — PMID: 10381589 PMCID: PMC2269433
- [164] NONOGUCHI, H ; KNEPPER, M A ; MANGANIELLO, V C: Effects of atrial natriuretic factor on cyclic guanosine monophosphate and cyclic adenosine monophosphate accumulation in microdissected nephron segments from rats. In: *The Journal of clinical investigation* Bd. 79 (1987), Nr. 2, S. 500–507. — PMID: 3027127 PMCID: PMC424113
- [165] NONOGUCHI, H ; SANDS, J M ; KNEPPER, M A: ANF inhibits NaCl and fluid absorption in cortical collecting duct of rat kidney. In: *The American journal of physiology* Bd. 256 (1989), Nr. 1 Pt 2, S. F179–186. — PMID: 2521430
- [166] OGAWA, Y ; ITOH, H ; TAMURA, N ; SUGA, S ; YOSHIMASA, T ; UEHIRA, M ; MATSUDA, S ; SHIONO, S ; NISHIMOTO, H ; U. A.: Molecular cloning of the complementary DNA and gene that encode mouse brain natriuretic peptide and generation of transgenic mice that overexpress the brain natriuretic peptide gene. In: *The Journal of clinical investigation* Bd. 93 (1994), Nr. 5, S. 1911–1921. — PMID: 8182124 PMCID: PMC294298
- [167] OSTER, HENRIK ; WERNER, CLAUDIA ; MAGNONE, MARIA CHIARA ; MAYSER, HELMUT ; FEIL, ROBERT ; SEELIGER, MATHIAS W ; HOFMANN, FRANZ ; ALBRECHT, URS: cGMP-dependent protein kinase II modulates mPer1 and mPer2 gene induction and influences phase shifts of the circadian clock. In: *Current biology: CB* Bd. 13 (2003), Nr. 9, S. 725–733. — PMID: 12725729
- [168] VAN DEN OUWELAND, A M ; DREESEN, J C ; VERDIJK, M ; KNOERS, N V ; MONNENS, L A ; ROCCHI, M ; VAN OOST, B A: Mutations in the vasopressin type 2 receptor gene (AVPR2) associated with nephrogenic diabetes insipidus. In: *Nature genetics* Bd. 2 (1992), Nr. 2, S. 99–102. — PMID: 1303271
- [169] PACHECO-ALVAREZ, DIANA ; CRISTÓBAL, PEDRO SAN ; MEADE, PATRICIA ; MORENO, ERIKA ; VAZQUEZ, NORMA ; MUÑOZ, EVA ; DÍAZ, ABIGAIL ; JUÁREZ, MARÍA EUGENIA ; GIMÉNEZ, IGNACIO ; U. A.: The Na⁺:Cl⁻ cotransporter is activated and phosphorylated at the amino-terminal domain upon intracellular chloride depletion. In: *The Journal of biological chemistry* Bd. 281 (2006), Nr. 39, S. 28755–28763. — PMID: 16887815
- [170] PAUL, CINDY ; SCHÖBERL, FLORIAN ; WEINMEISTER, PASCAL ; MICALE, VINCENZO ; WOTJAK, CARSTEN T ; HOFMANN, FRANZ ; KLEPPISCH, THOMAS: Signaling through cGMP-dependent protein kinase I in the amygdala is critical for auditory-cued fear memory and long-term

- potentiation. In: *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience* Bd. 28 (2008), Nr. 52, S. 14202–14212. — PMID: 19109502
- [171] PECH, VLADIMIR ; THUMOVA, MONIKA ; DIKALOV, SERGEY I ; HUMMLER, EDITH ; ROSSIER, BERNARD C ; HARRISON, DAVID G ; WALL, SUSAN M: Nitric oxide reduces Cl⁻ absorption in the mouse cortical collecting duct through an ENaC-dependent mechanism. In: *American journal of physiology. Renal physiology* Bd. 304 (2013), Nr. 11, S. F1390–1397. — PMID: 23515718 PMCID: PMC3680692
- [172] PFEIFER, A ; KLATT, P ; MASSBERG, S ; NY, L ; SAUSBIER, M ; HIRNEISS, C ; WANG, G X ; KORTH, M ; ASZÓDI, A ; U. A.: Defective smooth muscle regulation in cGMP kinase I-deficient mice. In: *The EMBO journal* Bd. 17 (1998), Nr. 11, S. 3045–3051. — PMID: 9606187 PMCID: PMC1170644
- [173] PFEIFER, A ; RUTH, P ; DOSTMANN, W ; SAUSBIER, M ; KLATT, P ; HOFMANN, F: Structure and function of cGMP-dependent protein kinases. In: *Reviews of physiology, biochemistry and pharmacology* Bd. 135 (1999), S. 105–149. — PMID: 9932482
- [174] PFEIFER, ALEXANDER ; ASZÓDI, ATTILA ; SEIDLER, URSULA ; RUTH, PETER ; HOFMANN, FRANZ ; FÄSSLER, REINHARD: Intestinal Secretory Defects and Dwarfism in Mice Lacking cGMP-Dependent Protein Kinase II. In: *Science* Bd. 274 (1996), Nr. 5295, S. 2082–2086. — PMID: 8953039
- [175] PITARI, GIOVANNI M: Pharmacology and clinical potential of guanylyl cyclase C agonists in the treatment of ulcerative colitis. In: *Drug Design, Development and Therapy* Bd. 7 (2013), S. 351–360. — PMID: 23637522 PMCID: PMC3634396
- [176] POSCHET, JENS F ; TIMMINS, GRAHAM S ; TAYLOR-COUSAR, JENNIFER L ; ORNATOWSKI, WOJCIECH ; FAZIO, JOSEPH ; PERKETT, ELIZABETH ; WILSON, KARI R ; YU, HONGWEI D ; DE JONGE, HUGO R ; U. A.: Pharmacological modulation of cGMP levels by phosphodiesterase 5 inhibitors as a therapeutic strategy for treatment of respiratory pathology in cystic fibrosis. In: *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology* Bd. 293 (2007), Nr. 3, S. L712–719. — PMID: 17586695
- [177] PRESTON, RICHARD A ; AFSHARTOUS, DAVID ; FORTE, LEONARD R ; RODCO, ROLANDO ; ALONSO, ALBERTO B ; GARG, DYAL ; RAIJ, LEOPOLDO: Sodium challenge does not support an acute gastrointestinal-renal natriuretic signaling axis in humans. In: *Kidney international* Bd. 82 (2012), Nr. 12, S. 1313–1320. — PMID: 22874843
- [178] PUJO, LUCIE ; FAGART, JÉRÔME ; GARY, FRANÇOISE ; PAPADIMITRIOU, DIMITRIS T ; CLAËS, AURÉLIE ; JEUNEMAÎTRE, XAVIER ; ZENNARO, MARIA-CHRISTINA: Mineralocorticoid receptor mutations are the principal cause of renal type 1 pseudohypoaldosteronism. In: *Human mutation* Bd. 28 (2007), Nr. 1, S. 33–40. — PMID: 16972228
- [179] RABAUD, NICOLE E ; SONG, LINHUA ; WANG, YIDING ; AGRE, PETER ; YASUI, MASATO ; CARBREY, JENNIFER M: Aquaporin 6 binds calmodulin in a calcium-dependent manner. In: *Biochemical and biophysical research communications* Bd. 383 (2009), Nr. 1, S. 54–57. — PMID: 19336226 PMCID: PMC2695410
- [180] RADIN, M. JUDITH ; YU, MING-JIUN ; STOEDKILDE, LENE ; MILLER, R. LANCE ; HOFFERT, JASON D. ; FROKIAER, JORGEN ; PISITKUN, TRAIRAK ; KNEPPER, MARK A.: Aquaporin-2 Regulation in Health and Disease. In: *Veterinary clinical pathology / American Society for Veterinary Clinical Pathology* Bd. 41 (2012), Nr. 4, S. 455–470. — PMID: 23130944 PMCID: PMC3562700
- [181] REIDL, L S ; CAMPAGNONI, C W ; CAMPAGNONI, A T: Preparation and properties of an immunosorbent column specific for the myelin basic protein. In: *Journal of neurochemistry* Bd. 37 (1981), Nr. 2, S. 373–380. — PMID: 6167677
- [182] REN, X D ; KIOSSES, W B ; SCHWARTZ, M A: Regulation of the small GTP-binding protein Rho by cell adhesion and the cytoskeleton. In: *The EMBO journal* Bd. 18 (1999), Nr. 3, S. 578–585. — PMID: 9927417 PMCID: PMC1171150
- [183] REN, YILIN ; D'AMBROSIO, MARTIN A. ; GARVIN, JEFFREY L. ; WANG, HONG ; CARRETERO, OSCAR A.: Mechanism of Inhibition of Tubuloglomerular Feedback by CO and cGMP. In: *Hypertension* Bd. 62 (2013), Nr. 1, S. 99–104. — PMID: 23648700
- [184] REVERMANN, MARC ; MARONDE, ERIK ; RUTH, PETER ; KORF, HORST-WERNER: Protein kinase G I immunoreaction is colocalized with arginine-vasopressin immunoreaction in the rat suprachiasmatic nucleus. In: *Neuroscience letters* Bd. 334 (2002), Nr. 2, S. 119–122. — PMID: 12435486

-
- [185] RITTER, D ; DEAN, A D ; GLUCK, S L ; GREENWALD, J E: Natriuretic peptide receptors A and B have different cellular distributions in rat kidney. In: *Kidney international* Bd. 48 (1995), Nr. 6, S. 5758–5766. — PMID: 8587268
 - [186] ROBBEN, JORIS H ; KNOERS, NINE V A M ; DEEN, PETER M T: Cell biological aspects of the vasopressin type-2 receptor and aquaporin 2 water channel in nephrogenic diabetes insipidus. In: *American journal of physiology. Renal physiology* Bd. 291 (2006), Nr. 2, S. F257–270. — PMID: 16825342
 - [187] ROSENTHAL, W ; SEIBOLD, A ; ANTARAMIAN, A ; LONERGAN, M ; ARTHUS, M F ; HENDY, G N ; BIRNBAUMER, M ; BICHET, D G: Molecular identification of the gene responsible for congenital nephrogenic diabetes insipidus. In: *Nature* Bd. 359 (1992), Nr. 6392, S. 233–235. — PMID: 1356229
 - [188] ROSETTE, C ; KARIN, M: Ultraviolet light and osmotic stress: activation of the JNK cascade through multiple growth factor and cytokine receptors. In: *Science (New York, N.Y.)* Bd. 274 (1996), Nr. 5290, S. 1194–1197. — PMID: 8895468
 - [189] ROSSIER, BERNARD C ; PRADERVAND, SYLVAIN ; SCHILD, LAURENT ; HUMMLER, EDITH: Epithelial sodium channel and the control of sodium balance: interaction between genetic and environmental factors. In: *Annual review of physiology* Bd. 64 (2002), S. 877–897. — PMID: 11826291
 - [190] RUTH, P ; LANDGRAF, W ; KEILBACH, A ; MAY, B ; EGLEME, C ; HOFMANN, F: The activation of expressed cGMP-dependent protein kinase isozymes I alpha and I beta is determined by the different amino-termini. In: *European journal of biochemistry / FEBS* Bd. 202 (1991), Nr. 3, S. 1339–1344. — PMID: 1662612
 - [191] RUTH, P ; PFEIFER, A ; KAMM, S ; KLATT, P ; DOSTMANN, W R ; HOFMANN, F: Identification of the amino acid sequences responsible for high affinity activation of cGMP kinase Ialpha. In: *The Journal of biological chemistry* Bd. 272 (1997), Nr. 16, S. 10522–10528. — PMID: 9099696
 - [192] SABOLIĆ, I ; KATSURA, T ; VERBAVATZ, J M ; BROWN, D: The AQP2 water channel: effect of vasopressin treatment, microtubule disruption, and distribution in neonatal rats. In: *The Journal of membrane biology* Bd. 143 (1995), Nr. 3, S. 165–175. — PMID: 7539496
 - [193] SAIKI, R K ; GELFAND, D H ; STOFFEL, S ; SCHARF, S J ; HIGUCHI, R ; HORN, G T ; MULLIS, K B ; ERLICH, H A: Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. In: *Science (New York, N.Y.)* Bd. 239 (1988), Nr. 4839, S. 487–491. — PMID: 2448875
 - [194] SAMSON, W K ; AGUILA, M C ; MARTINOVIC, J ; ANTUNES-RODRIGUES, J ; NORRIS, M: Hypothalamic action of atrial natriuretic factor to inhibit vasopressin secretion. In: *Peptides* Bd. 8 (1987), Nr. 3, S. 449–454. — PMID: 2958784
 - [195] SANDS, JEFF M ; BICHET, DANIEL G ; AMERICAN COLLEGE OF PHYSICIANS ; AMERICAN PHYSIOLOGICAL SOCIETY: Nephrogenic diabetes insipidus. In: *Annals of internal medicine* Bd. 144 (2006), Nr. 3, S. 186–194. — PMID: 16461963
 - [196] SANDS, JEFF M. ; LAYTON, HAROLD E.: The Physiology of Urinary Concentration: an Update. In: *Seminars in nephrology* Bd. 29 (2009), Nr. 3, S. 178–195. — PMID: 19523568 PMCID: PMC2709207
 - [197] SAPAROV, SAPAR M ; LIU, KUN ; AGRE, PETER ; POHL, PETER: Fast and selective ammonia transport by aquaporin-8. In: *The Journal of biological chemistry* Bd. 282 (2007), Nr. 8, S. 5296–5301. — PMID: 17189259 PMCID: PMC3056221
 - [198] SASAKI, S ; FUSHIMI, K ; ISHIBASHI, K ; MARUMO, F: Water channels in the kidney collecting duct. In: *Kidney international* Bd. 48 (1995), Nr. 4, S. 1082–1087. — PMID: 8569069
 - [199] SAWYER, W H ; ACOSTA, M ; BALASPIRI, L ; JUDD, J ; MANNING, M: Structural changes in the arginine vasopressin molecule that enhance antidiuretic activity and specificity. In: *Endocrinology* Bd. 94 (1974), Nr. 4, S. 1106–1115. — PMID: 4818770
 - [200] SCHÄGGER, H ; VON JAGOW, G: Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. In: *Analytical biochemistry* Bd. 166 (1987), Nr. 2, S. 368–379. — PMID: 2449095
 - [201] SCHIEBL, INA MARIA ; ROSENAUER, AGNES ; KATTLER, VERONIKA ; MINUTH, WILL W. ; OPPERMAN, MONA ; CASTROP, HAYO: Dietary salt intake modulates differential splicing of the Na-K-2Cl cotransporter NKCC2. In: *American Journal of Physiology - Renal Physiology* Bd. 305 (2013), Nr. 8, S. F1139–F1148. — PMID: 23946287

-
- [202] SCHINNER, ELISABETH ; SCHRAMM, ANDREA ; KEES, FRIEDER ; HOFMANN, FRANZ ; SCHLOSSMANN, JENS: The cyclic GMP-dependent protein kinase Ia suppresses kidney fibrosis. In: *Kidney International* Bd. 84 (2013), Nr. 6, S. 1198–1206
 - [203] SCHLATTER, E ; MÖNNICH, V ; CETINKAYA, I ; MEHRENS, T ; CIARIMBOLI, G ; HIRSCH, J R ; POPP, C ; KOEPEL, H: The organic cation transporters rOCT1 and hOCT2 are inhibited by cGMP. In: *The Journal of membrane biology* Bd. 189 (2002), Nr. 3, S. 237–244. — PMID: 12395288
 - [204] SCHMIDT, ROBERT F ; LANG, FLORIAN, HECKMANN, MANFRED: *Physiologie des Menschen mit Pathophysiologie ; mit 85 Tabellen ; mit herausnehmbarem Repetitorium*. Heidelberg : Springer-Medizin-Verl., 2010 — ISBN 9783642016509 3642016502
 - [205] SCHRICKER, K ; KURTZ, A: Liberators of NO exert a dual effect on renin secretion from isolated mouse renal juxtaglomerular cells. In: *The American journal of physiology* Bd. 265 (1993), Nr. 2 Pt 2, S. F180–186. — PMID: 8396340
 - [206] SCHRIER, ROBERT W: Body water homeostasis: clinical disorders of urinary dilution and concentration. In: *Journal of the American Society of Nephrology: JASN* Bd. 17 (2006), Nr. 7, S. 1820–1832. — PMID: 16738014
 - [207] SCHRIER, ROBERT W ; GROSS, PETER ; GHEORGHIAD, MIHAI ; BERL, TOMAS ; VERBALIS, JOSEPH G ; CZERWIEC, FRANK S ; ORLANDI, CESARE ; SALT INVESTIGATORS: Tolvaptan, a selective oral vasopressin V2-receptor antagonist, for hyponatremia. In: *The New England journal of medicine* Bd. 355 (2006), Nr. 20, S. 2099–2112. — PMID: 17105757
 - [208] SCHULZ, S ; SINGH, S ; BELLET, R A ; SINGH, G ; TUBB, D J ; CHIN, H ; GARBERS, D L: The primary structure of a plasma membrane guanylate cyclase demonstrates diversity within this new receptor family. In: *Cell* Bd. 58 (1989), Nr. 6, S. 1155–1162. — PMID: 2570641
 - [209] SCHULZ-KNAPPE, P ; FORSSMANN, K ; HERBST, F ; HOCK, D ; PIPKORN, R ; FORSSMANN, W G: Isolation and structural analysis of „urodilatin“, a new peptide of the cardiodilatin-(ANP)-family, extracted from human urine. In: *Klinische Wochenschrift* Bd. 66 (1988), Nr. 17, S. 752–759. — PMID: 2972874
 - [210] SCHWEITZ, H ; VIGNE, P ; MOINIER, D ; FRELIN, C ; LAZDUNSKI, M: A new member of the natriuretic peptide family is present in the venom of the green mamba (*Dendroaspis angusticeps*). In: *The Journal of biological chemistry* Bd. 267 (1992), Nr. 20, S. 13928–13932. — PMID: 1352773
 - [211] SHERK, ANDREA B ; FRIGO, DANIEL E ; SCHNACKENBERG, CHRISTINE G ; BRAY, JEFFREY D ; LAPING, NICHOLAS J ; TRIZNA, WALTER ; HAMMOND, MARLYS ; PATTERSON, JACLYN R ; THOMPSON, SCOTT K ; U. A.: Development of a small-molecule serum- and glucocorticoid-regulated kinase-1 antagonist and its evaluation as a prostate cancer therapeutic. In: *Cancer research* Bd. 68 (2008), Nr. 18, S. 7475–7483. — PMID: 18794135 PMCID: PMC2562281
 - [212] SHI, HAIKUN ; ASHER, CAROL ; CHIGAEV, ALEXANDER ; YUNG, YUVAL ; REUVENY, EITAN ; SEGER, RONY ; GARTY, HAIM: Interactions of beta and gamma ENaC with Nedd4 can be facilitated by an ERK-mediated phosphorylation. In: *The Journal of biological chemistry* Bd. 277 (2002), Nr. 16, S. 13539–13547. — PMID: 11805112
 - [213] SHI, PEIJUN P ; CAO, XIAO R ; QU, JING ; VOLK, KEN A ; KIRBY, PATRICIA ; WILLIAMSON, ROGER A ; STOKES, JOHN B ; YANG, BAOLI: Nephrogenic diabetes insipidus in mice caused by deleting COOH-terminal tail of aquaporin-2. In: *American journal of physiology. Renal physiology* Bd. 292 (2007), Nr. 5, S. F1334–1344. — PMID: 17229678 PMCID: PMC2818797
 - [214] SHIMKETS, R A ; LIFTON, R ; CANESSA, C M: In vivo phosphorylation of the epithelial sodium channel. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* Bd. 95 (1998), Nr. 6, S. 3301–3305. — PMID: 9501257 PMCID: PMC19736
 - [215] SILVER, MARC A: The natriuretic peptide system: kidney and cardiovascular effects. In: *Current opinion in nephrology and hypertension* Bd. 15 (2006), Nr. 1, S. 14–21. — PMID: 16340661
 - [216] SINDIĆ, ALEKSANDRA ; SCHLATTER, EBERHARD: Cellular effects of guanylin and uroguanylin. In: *Journal of the American Society of Nephrology: JASN* Bd. 17 (2006), Nr. 3, S. 607–616. — PMID: 16382016
 - [217] SINDIĆ, ALEKSANDRA ; VELIC, ANA ; BAŞOĞLU, CANDAN ; HIRSCH, JOCHEN R ; EDEMIR, BAYRAM ; KUHN, MICHAELA ; SCHLATTER, EBERHARD: Uroguanylin and guanylin regulate transport of mouse cortical collecting duct independent of guanylate cyclase C. In: *Kidney international* Bd. 68 (2005), Nr. 3, S. 1008–1017. — PMID: 16105031

-
- [218] SINGHAL, P C ; DECANDIDO, S ; SATRIANO, J A ; SCHLONDORFF, D ; HAYS, R M: Atrial natriuretic peptide and nitroprusside cause relaxation of cultured rat mesangial cells. In: *The American journal of physiology* Bd. 257 (1989), Nr. 1 Pt 1, S. C86–93. — PMID: 2546436
 - [219] SNYDER, PETER M: Minireview: regulation of epithelial Na⁺ channel trafficking. In: *Endocrinology* Bd. 146 (2005), Nr. 12, S. 5079–5085. — PMID: 16150899
 - [220] SNYDER, PETER M ; OLSON, DIANE R ; KABRA, RAJESH ; ZHOU, RUIFENG ; STEINES, JENNIFER C: cAMP and serum and glucocorticoid-inducible kinase (SGK) regulate the epithelial Na(+) channel through convergent phosphorylation of Nedd4-2. In: *The Journal of biological chemistry* Bd. 279 (2004), Nr. 44, S. 45753–45758. — PMID: 15328345
 - [221] SOHARA, EISEI ; UCHIDA, SHINICHI ; SASAKI, SEI: Function of Aquaporin-7 in the Kidney and the Male Reproductive System. In: BEITZ, P. D. E. (Hrsg.): *Aquaporins, Handbook of Experimental Pharmacology*: Springer Berlin Heidelberg, 2009 — ISBN 978-3-540-79884-2, 978-3-540-79885-9, S. 219–231
 - [222] SONNENBURG, W K ; BEAVO, J A: Cyclic GMP and regulation of cyclic nucleotide hydrolysis. In: *Advances in pharmacology (San Diego, Calif.)* Bd. 26 (1994), S. 87–114. — PMID: 8038108
 - [223] SPIESSBERGER, BEATE ; BERNHARD, DOMINIK ; HERRMANN, STEFAN ; FEIL, SUSANNE ; WERNER, CLAUDIA ; LUPPA, PETER B ; HOFMANN, FRANZ: cGMP-dependent protein kinase II and aldosterone secretion. In: *The FEBS journal* Bd. 276 (2009), Nr. 4, S. 1007–1013. — PMID: 19154345
 - [224] STARUSCHENKO, ALEXANDER: Regulation of transport in the connecting tubule and cortical collecting duct. In: *Comprehensive Physiology* Bd. 2 (2012), Nr. 2, S. 1541–1584. — PMID: 23227301 PMCID: PMC3516049
 - [225] SUDA, M ; OGAWA, Y ; TANAKA, K ; TAMURA, N ; YASODA, A ; TAKIGAWA, T ; UEHIRA, M ; NISHIMOTO, H ; ITOH, H ; U. A.: Skeletal overgrowth in transgenic mice that overexpress brain natriuretic peptide. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* Bd. 95 (1998), Nr. 5, S. 2337–2342. — PMID: 9482886 PMCID: PMC19337
 - [226] SUDOH, T ; KANGAWA, K ; MINAMINO, N ; MATSUO, H: A new natriuretic peptide in porcine brain. In: *Nature* Bd. 332 (1988), Nr. 6159, S. 78–81. — PMID: 2964562
 - [227] SWARTLING, F J ; FERLETTA, M ; KASTEMAR, M ; WEISS, W A ; WESTERMARK, B: Cyclic GMP-dependent protein kinase II inhibits cell proliferation, Sox9 expression and Akt phosphorylation in human glioma cell lines. In: *Oncogene* Bd. 28 (2009), Nr. 35, S. 3121–3131. — PMID: 19543319 PMCID: PMC3030987
 - [228] TAHARA, A ; TOMURA, Y ; WADA, K I ; KUSAYAMA, T ; TSUKADA, J ; TAKANASHI, M ; YATSU, T ; UCHIDA, W ; TANAKA, A: Pharmacological profile of YM087, a novel potent nonpeptide vasopressin V1A and V2 receptor antagonist, in vitro and in vivo. In: *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* Bd. 282 (1997), Nr. 1, S. 301–308. — PMID: 9223568
 - [229] TAMMA, GRAZIA ; KLUSSMANN, ENNO ; PROCINO, GIUSEPPE ; SVELTO, MARIA ; ROSENTHAL, WALTER ; VALENTI, GIOVANNA: cAMP-induced AQP2 translocation is associated with RhoA inhibition through RhoA phosphorylation and interaction with RhoGDI. In: *Journal of Cell Science* Bd. 116 (2003), Nr. 8, S. 1519–1525. — PMID: 12640036
 - [230] TAMMA, GRAZIA ; PROCINO, GIUSEPPE ; STRAFINO, AGNESE ; BONONI, ELENA ; MEYER, GIULIANO ; PAULMICHL, MARKUS ; FORMOSO, VINCENZO ; SVELTO, MARIA ; VALENTI, GIOVANNA: Hypotonicity Induces Aquaporin-2 Internalization and Cytosol-to-Membrane Translocation of ICln in Renal Cells. In: *Endocrinology* Bd. 148 (2007), Nr. 3, S. 1118–1130
 - [231] TAMMA, GRAZIA ; ROBBEN, JORIS H ; TRIMPERT, CHRISTIANE ; BOONE, MICHELLE ; DEEN, PETER M T: Regulation of AQP2 localization by S256 and S261 phosphorylation and ubiquitination. In: *American journal of physiology. Cell physiology* Bd. 300 (2011), Nr. 3, S. C636–646. — PMID: 21148409
 - [232] TANIHARA, YUKO ; MASUDA, SATOHIRO ; SATO, TOMOKO ; KATSURA, TOSHIYA ; OGAWA, OSAMU ; INUI, KEN-ICHI: Substrate specificity of MATE1 and MATE2-K, human multidrug and toxin extrusions/H(+)-organic cation antiporters. In: *Biochemical pharmacology* Bd. 74 (2007), Nr. 2, S. 359–371. — PMID: 17509534
 - [233] TAOUFIQ, ZACHARIE ; EGUCHI, KOHAKU ; TAKAHASHI, TOMOYUKI: Rho-kinase accelerates synaptic vesicle endocytosis by linking cyclic GMP-dependent protein kinase activity to

- phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate synthesis. In: *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience* Bd. 33 (2013), Nr. 29, S. 12099–12104. — PMID: 23864695
- [234] THOMAS, CHRISTIE P ; CAMPBELL, JASON R ; WRIGHT, PATRICK J ; HUSTED, RUSSELL F: cAMP-stimulated Na⁺ transport in H441 distal lung epithelial cells: role of PKA, phosphatidylinositol 3-kinase, and sgk1. In: *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology* Bd. 287 (2004), Nr. 4, S. L843–851. — PMID: 15208094
- [235] UFER, FRIEDERIKE ; DIEDERICH, SVEN ; PEDERSEN, ERLING B ; SPRANGER, JOACHIM ; PFEIFFER, ANDREAS F H ; BÄHR, VOLKER ; MAI, KNUT: Arginine vasopressin-dependent and AVP-independent mechanisms of renal fluid absorption during thirsting despite glucocorticoid-mediated vasopressin suppression. In: *Clinical endocrinology* Bd. 78 (2013), Nr. 3, S. 431–437. — PMID: 22882308
- [236] URAKAMI, YUMIKO ; KIMURA, NAOKO ; OKUDA, MASAHIRO ; INUI, KEN-ICHI: Creatinine transport by basolateral organic cation transporter hOCT2 in the human kidney. In: *Pharmaceutical research* Bd. 21 (2004), Nr. 6, S. 976–981. — PMID: 15212162
- [237] VAANDRAGER, A B ; BOT, A G ; DE JONGE, H R: Guanosine 3',5'-cyclic monophosphate-dependent protein kinase II mediates heat-stable enterotoxin-provoked chloride secretion in rat intestine. In: *Gastroenterology* Bd. 112 (1997), Nr. 2, S. 437–443. — PMID: 9024297
- [238] VAANDRAGER, A B ; BOT, A G ; RUTH, P ; PFEIFER, A ; HOFMANN, F ; DE JONGE, H R: Differential role of cyclic GMP-dependent protein kinase II in ion transport in murine small intestine and colon. In: *Gastroenterology* Bd. 118 (2000), Nr. 1, S. 108–114. — PMID: 10611159
- [239] VAANDRAGER, A B ; EHLERT, E M ; JARCHAU, T ; LOHMANN, S M ; DE JONGE, H R: N-terminal myristoylation is required for membrane localization of cGMP-dependent protein kinase type II. In: *The Journal of biological chemistry* Bd. 271 (1996), Nr. 12, S. 7025–7029. — PMID: 8636133
- [240] VAANDRAGER, A B ; SMOLENSKI, A ; TILLY, B C ; HOUTSMULLER, A B ; EHLERT, E M ; BOT, A G ; EDIXHOVEN, M ; BOOMAARS, W E ; LOHMANN, S M ; U. A.: Membrane targeting of cGMP-dependent protein kinase is required for cystic fibrosis transmembrane conductance regulator Cl⁻ channel activation. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* Bd. 95 (1998), Nr. 4, S. 1466–1471. — PMID: 9465038 PMCID: PMC19047
- [241] VAANDRAGER, ARIE B ; HOGEMA, BORIS M ; EDIXHOVEN, MARCEL ; VAN DEN BURG, CAROLINE M M ; BOT, ALICE G M ; KLATT, PETER ; RUTH, PETER ; HOFMANN, FRANZ ; VAN DAMME, JOZEF ; U. A.: Autophosphorylation of cGMP-dependent protein kinase type II. In: *The Journal of biological chemistry* Bd. 278 (2003), Nr. 31, S. 28651–28658. — PMID: 12764134
- [242] VANDEWALLE, A ; CLUZEAUD, F ; BENS, M ; KIEFERLE, S ; STEINMEYER, K ; JENTSCH, T J: Localization and induction by dehydration of ClC-K chloride channels in the rat kidney. In: *The American journal of physiology* Bd. 272 (1997), Nr. 5 Pt 2, S. F678–688. — PMID: 9176380
- [243] VÁVRA, I ; MACHOVÁ, A ; HOLECEK, V ; CORT, J H ; ZAORAL, M ; SORM, F: Effect of a synthetic analogue of vasopressin in animals and in patients with diabetes insipidus. In: *Lancet* Bd. 1 (1968), Nr. 7549, S. 948–952. — PMID: 4171585
- [244] VERKMAN, A S: More than just water channels: unexpected cellular roles of aquaporins. In: *Journal of cell science* Bd. 118 (2005), Nr. Pt 15, S. 3225–3232. — PMID: 16079275
- [245] LA VILLA, G ; FRONZAROLI, C ; LAZZERI, C ; PORCIANI, C ; BANDINELLI, R ; VENA, S ; MESSERI, G ; FRANCHI, F: Cardiovascular and renal effects of low dose brain natriuretic peptide infusion in man. In: *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* Bd. 78 (1994), Nr. 5, S. 1166–1171. — PMID: 8175974
- [246] VOLPE, MASSIMO ; RUBATTU, SPERANZA ; BURNETT, JOHN, JR: Natriuretic peptides in cardiovascular diseases: current use and perspectives. In: *European heart journal* (2013). — PMID: 24227810
- [247] WADE, J B ; STETSON, D L ; LEWIS, S A: ADH action: evidence for a membrane shuttle mechanism. In: *Annals of the New York Academy of Sciences* Bd. 372 (1981), S. 106–117. — PMID: 6951416

-
- [248] WAGNER, C ; PFEIFER, A ; RUTH, P ; HOFMANN, F ; KURTZ, A: Role of cGMP-kinase II in the control of renin secretion and renin expression. In: *The Journal of clinical investigation* Bd. 102 (1998), Nr. 8, S. 1576–1582. — PMID: 9788971 PMCID: PMC509008
 - [249] WALSER, M: Assessing renal function from creatinine measurements in adults with chronic renal failure. In: *American journal of kidney diseases: the official journal of the National Kidney Foundation* Bd. 32 (1998), Nr. 1, S. 23–31. — PMID: 9669420
 - [250] WANG, WEIDONG ; LI, CHUNLING ; NEJSUM, LENE N ; LI, HONGYAN ; KIM, SOO WAN ; KWON, TAE-HWAN ; JONASSEN, THOMAS E N ; KNEPPER, MARK A ; THOMSEN, KLAUS ; U. A.: Biphasic effects of ANP infusion in conscious, euolumic rats: roles of AQP2 and ENaC trafficking. In: *American journal of physiology. Renal physiology* Bd. 290 (2006), Nr. 2, S. F530–541. — PMID: 16174867
 - [251] WATSON, HUGH ; JEPSEN, PETER ; WONG, FLORENCE ; GINÈS, PERE ; CÓRDOBA, JUAN ; VILSTRUP, HENDRIK: Satavaptan treatment for ascites in patients with cirrhosis: a meta-analysis of effect on hepatic encephalopathy development. In: *Metabolic brain disease* Bd. 28 (2013), Nr. 2, S. 301–305. — PMID: 23463488
 - [252] WATTS, B A, 3RD ; GOOD, D W: Hyposmolality stimulates apical membrane Na(+)/H(+) exchange and HCO(3)(-) absorption in renal thick ascending limb. In: *The Journal of clinical investigation* Bd. 104 (1999), Nr. 11, S. 1593–1602. — PMID: 10587523 PMCID: PMC409859
 - [253] WERNER, CLAUDIA ; RAIVICH, GENNADIJ ; COWEN, MICHAEL ; STREKALOVA, TATYANA ; SILLABER, INGE ; BUTERS, JEROEN T ; SPANAGEL, RAINER ; HOFMANN, FRANZ: Importance of NO/cGMP signalling via cGMP-dependent protein kinase II for controlling emotionality and neurobehavioural effects of alcohol. In: *The European journal of neuroscience* Bd. 20 (2004), Nr. 12, S. 3498–3506. — PMID: 15610182
 - [254] WERNET, W ; FLOCKERZI, V ; HOFMANN, F: The cDNA of the two isoforms of bovine cGMP-dependent protein kinase. In: *FEBS letters* Bd. 251 (1989), Nr. 1-2, S. 191–196. — PMID: 2546820
 - [255] WIEMUTH, DOMINIK ; LOTT, J SHAUN ; LY, KEVIN ; KE, YING ; TEESDALE-SPITTLE, PAUL ; SNYDER, PETER M ; McDONALD, FIONA J: Interaction of serum- and glucocorticoid regulated kinase 1 (SGK1) with the WW-domains of Nedd4-2 is required for epithelial sodium channel regulation. In: *PLoS one* Bd. 5 (2010), Nr. 8, S. e12163. — PMID: 20730100 PMCID: PMC2921341
 - [256] WILDE, S ; SCHLATTER, E ; KOEPESELL, H ; EDEMIR, B ; REUTER, S ; PAVENSTÄDT, H ; NEUGEBAUER, U ; SCHRÖTER, R ; BRAST, S ; U. A.: Calmodulin-associated post-translational regulation of rat organic cation transporter 2 in the kidney is gender dependent. In: *Cellular and molecular life sciences: CMLS* Bd. 66 (2009), Nr. 10, S. 1729–1740. — PMID: 19330287
 - [257] WILLIAMS, T. D. ; WALSH, K. P. ; LIGHTMAN, S. L. ; SUTTON, R.: Atrial natriuretic peptide inhibits postural release of renin and vasopressin in humans. In: *American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* Bd. 255 (1988), Nr. 3, S. R368–R372. — PMID: 2970806
 - [258] WILSON, F H ; DISSE-NICODÈME, S ; CHOATE, K A ; ISHIKAWA, K ; NELSON-WILLIAMS, C ; DESITTER, I ; GUNEL, M ; MILFORD, D V ; LIPKIN, G W ; U. A.: Human hypertension caused by mutations in WNK kinases. In: *Science (New York, N.Y.)* Bd. 293 (2001), Nr. 5532, S. 1107–1112. — PMID: 11498583
 - [259] WOLFERTSTETTER, STEFANIE ; HUETTNER, JOHANNES P ; SCHLOSSMANN, JENS: cGMP-Dependent Protein Kinase Inhibitors in Health and Disease. In: *Pharmaceuticals (Basel, Switzerland)* Bd. 6 (2013), Nr. 2, S. 269–286. — PMID: 24275951 PMCID: PMC3816681
 - [260] XIE, LUKE ; HOFFERT, JASON D ; CHOU, CHUNG-LIN ; YU, MING-JIUN ; PISITKUN, TRAIRAK ; KNEPPER, MARK A ; FENTON, ROBERT A: Quantitative analysis of aquaporin-2 phosphorylation. In: *American journal of physiology. Renal physiology* Bd. 298 (2010), Nr. 4, S. F1018–1023. — PMID: 20089674 PMCID: PMC2853310
 - [261] YAMADA, TOSHIKI ; KONNO, NORIFUMI ; MATSUDA, KOUHEI ; UCHIYAMA, MINORU: Frog atrial natriuretic peptide and cGMP activate amiloride-sensitive Na(+) channels in urinary bladder cells of Japanese tree frog, *Hyla japonica*. In: *Journal of comparative physiology. B, Biochemical, systemic, and environmental physiology* Bd. 177 (2007), Nr. 5, S. 503–508. — PMID: 17549497
 - [262] YAMADA, TOSHIKI ; MATSUDA, KOUHEI ; UCHIYAMA, MINORU: Frog ANP increases the amiloride-sensitive Na(+) channel activity in urinary bladder cells of Japanese tree frog,

- Hyla japonica. In: *General and comparative endocrinology* Bd. 152 (2007), Nr. 2-3, S. 286–288. — PMID: 17184780
- [263] YASUI, MASATO: pH regulated anion permeability of aquaporin-6. In: *Handbook of experimental pharmacology* (2009), Nr. 190, S. 299–308. — PMID: 19096784
- [264] ZWANG, NICHOLAS A ; HOFFERT, JASON D ; PISITKUN, TRAIRAK ; MOELLER, HANNE B ; FENTON, ROBERT A ; KNEPPER, MARK A: Identification of phosphorylation-dependent binding partners of aquaporin-2 using protein mass spectrometry. In: *Journal of proteome research* Bd. 8 (2009), Nr. 3, S. 1540–1554. — PMID: 19209902 PMCID: PMC2693456

Eigene wissenschaftliche Veröffentlichungen:und Vorträge

Publikationen

- WEIGERT, J; NEUMEIER, M; WANNINGER, J; SCHÖBER, F; SPORRER, D; WEBER, M; SCHRAMM, A; WURM, S; STÖGBAUER, F; U. A.: Adiponectin upregulates monocytic activin A but systemic levels are not altered in obesity or type 2 diabetes. In: *Cytokine* Bd. 45 (2009), Nr. 2, S. 86–91.
- SCHINNER, E; SCHRAMM, A; KEES, F; HOFMANN, F; SCHLOSSMANN, J: The cyclic GMP-dependent protein kinase Ia suppresses kidney fibrosis. In: *Kidney international* Bd. 84 (2013), Nr. 6, S. 1198–1206.
- SCHRAMM, A; SCHINNER, E; HUETTNER, J; KEES, F; TAUBER, P; HOFMANN, F; SCHLOSSMANN, J: Function of cGMP-dependent protein kinase II in volume load-induced diuresis. In: *Pflugers Archiv: European journal of physiology* (2014), DOI 10.1007.

Vorträge und Poster

2010 Renal function of cGKII *Summerschool of SFB699 (Hersbruck, D), 2010*

Diverse Poster-Beiträge auf Kongressen (Jahrestagungen der Deutschen pharmakologischen und toxikologischen Gesellschaft (DPTG), Jahrestagungen der Deutschen physiologischen Gesellschaft (DPG) sowie International Conferences on cGMP, Generators, Effectors and Therapeutig Implications)

H. Anhang

H.1 Abkürzungsverzeichnis

°C	° Celsius	min	Minute
μ	Mikro	n	Nano
A	Amper	NDI	Nephrogener Diabetes insipidus
a.u.c.	Area under curve	NEDD4-2	Neural precursor cell expressed developmentally downregulated protein
AC	Adenylat-Cyclase	NEP	Neutrale Endopeptidase
ADH	Anti-diuretisches Hormon	NHE3	Na ⁺ /H ⁺ -Exchanger 3
AKAP	PKA-Anker-Protein	NKCC2	Na ⁺ -K ⁺ -2Cl ⁻ -Cotransporter
AMP	Adenosin-Mono-Phosphat	NO	Stickstoffmonoxid
Amp	Ampicillin	NOS	NO-Synthase
ANP	Atriales natriuretisches Peptide	NP	Natriuretisches Peptid
AQP	Aquaporin	NPR	NP-Rezeptor
ASDN	Aldosteron-sensitives distales Nephron	OCT	Organic cation transporter
ATP	Adenosin-Tri-Phosphat	OD	Optische Dichte
AVP	Arginin-Vasopressin	OMCD	Outer medullary collecting duct
BNP	Brain natriuretisches Peptid	p	Pico
bpm	Beats per minute	PA	Poly-Acrylamid
BW	Body weight/Körpergewicht	PBS	Phosphate-buffered saline
cAMP	Cyclisches Adenosin-Mono-Phosphat	PCR	Polymerase chain reaction
CCT	Corticaler Verbindungstubulus	PDE	Phosphodiesterase
CFTR	Cystic fibrosis transmembrane regulator	PFA	Paraformaldehyd
cGK	cGMP-abhängige Proteinkinase	pGC	Partikuläre Guanylat-Cyclase
cGMP	Cyclisches Guanosin-Mono-Phosphat	PHA	Pseudohypoadosteronismus
CLSM	Confocal laser scanning microscopy	PI	Protease-Inhibitoren
CNG	Cyclic nucleotide gated	PKA	Proteinkinase A
CNP	C-Typ natriuretisches Peptid	PKG	Proteinkinase G
d	Tag	PKN1	Proteinkinase N1
DCI	Diabetes centralis insipidus	PM	Plasmamembran
DCT	Distaler Connecting-Tubulus	PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
dDAVP	Desmopressin (1-Desamino-8-D-Arginin-Vasopressin)	ppm	Parts per million
DEPC	Diethylpyrocarbonat	PVDF	Polyvinylidenfluorid
DNP	Dendroaspis natriuretisches Peptid	RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
dNTP	Desoxyribonukleosid-Triphosphat	RBS	Ribosomen-Bindestelle
E.coli	Escherichia coli	REN	Restriktions-Endonukleasen
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure	ROCK	Rho-Kinase
EGTA	Ethylenglycoltetraessigsäure	ROMK	Renal outer medullary potassium channel
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent Assay	rpm	Revolutions per minute
EMEA	European Medicines Agency	RT	Raumtemperatur
ENaC	Epithelialer Natrium-Kanal	SAP	Shrimp alkaline phosphatase
ER	Endoplasmatisches Reticulum	SDS	Sodium dodecyl sulfate
ERK 1/2	Extracellulär-signal regulated kinase 1/2	SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidelektrophorese
FDA	Food and Drug Administration	SEM	Standard error of the mean
g	Gramm	sGC	Soluble guanylate cyclase
GDP	Guanosin-Di-Phosphat	SGK	Serum-und Glucocorticoid-induzierbare Proteinkinase
GFR	Glomeruläre Filtrationsrate	SIAD	Syndrom der inadäquaten Antidiurese
GIT	Gastrointestinaltrakt	SIADH	Syndrom der inadäquaten ADH-Sekretion
GKAP	cGK-Anker-Protein	SOB	Super optimal broth
GMP	Guanosin-Mono-Phosphat	SOC	Super optimal broth + carbon
GN	Guanylin	SSRI	Selective serotonin reuptake inhibitor
GPCR	G-Protein-coupled receptor	TAE	Tris-Acetat-EDTA
GTP	Guanosin-Tri-Phosphat	TBS	Tris-buffered saline
h	Stunde	TBST	Tris-buffered saline + Tween
HPLC	High performance liquid chromatography	TCA	Trichloressigsäure
HRC	Hormone response element	TEMED	Tetramethylethylendiamin
HRP	Horse reddish peroxidase	TGF	Tubuloglomeruläres Feedback
I.E.	Internationale Einheit	U	Unit
i.p.	Intraperitoneal	UCI ⁺ V	Chlorid-Exkretion
IMCD	Inner-medullary collecting duct	UD	Urodilatin
IPTG	Isopropyl-Thiogalactopyranosid	UGN	Uroguanylin
IRAG	IP ₃ -Rezeptor-assoziiertes cGMP-Kinase-Substrat	UK ⁺ V	Kalium-Exkretion
K	Kontrolle	UKreaV	Kreatinin-Exkretion
kDa	Kilo-Dalton	ün	Über Nacht
kg	Kilogramm	UNa ⁺ V	Natrium-Exkretion
KG	Körpergewicht	ÜNK	Übernachtkultur
KO	Knockout	V	Volt
Krea	Kreatinin	v/v	Volume per volume
l	Liter	V2R	V2-Rezeptor
LB	Lysogeny broth	VASP	Vasodilatator-stimuliertes Phosphoprotein
m	Mili	VM	Vesikelmembran
M	Molar	VP	Vasopressin
MAP	Mean arterial pressure	w/v	Weight per volume
MAPK	Mitogen-aktivierte Protein-Kinase	WL	Water Load
MATE	Multidrug and toxin extrusion	WT	Wildtyp

H.2 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Der NP/NO/cGMP-Signaltransduktionsweg	6
Abb. 2: Schematische Darstellung der Struktur der cGKs	8
Abb. 3: Phänotypische Ausprägung einer genetischen Deletion der cGKII	10
Abb. 4: Schematische Darstellung eines Nephrons.....	14
Abb. 5: Die Wasser-Rückresorption im Sammelrohr	19
Abb. 6: Die Funktion von Aldosteron im DCT und Sammelrohr.....	24
Abb. 7: Vektorkarte pRSET-Expressionsvektor	34
Abb. 8: Retrograde Perfusion	48
Abb. 9: Qualitativer Restriktionsverdau zur Überprüfung der erfolgreichen Transformation sowie der korrekten Orientierung.....	55
Abb. 10: Analyse der cGKII-N-Terminus-Expression mit unterschiedlichen Expressionszeiten ...	56
Abb. 11: Analyse der Aufreinigung des cGKII-N-Terminus durch Ni-NTA-Chromatographie	57
Abb. 12 Überprüfung der Antigen-Erkennung sowie der Erkennung von cGKII im Gewebe nach cGMP-Agarosefällung	59
Abb. 13: Depletion des cGKII-Antikörpers	60
Abb. 14: cGKII-Expression in Cortex und Medulla.....	61
Abb. 15: Nierengewicht von WT- und cGKII-KO-Mäusen.....	62
Abb. 16: Renale Parameter unter Wasser- und Futterentzug.....	65
Abb. 17: Immunhistochemische Analyse von AQP2 nach 18h Wasserentzug	66
Abb. 18: Urin-Menge in Abh. des applizierten Volumens	67
Abb. 19: Urin-Volumen und Natrium-Molmengen nach Verabreichung einer isotonen Lösung	67
Abb. 20: Urin-Volumen und Natrium-Molmengen nach Verabreichung einer hypertonen Lösung	68
Abb. 21: Urin-Volumen und Natrium-Molmengen nach Verabreichung einer hypotonen Lösung.	69
Abb. 22: Kalium-Molmengen nach Applikation osmolar-unterschiedlicher Lösungen.....	70
Abb. 23: Kumulative Auftragung der erhaltenen Urin-Parameter nach WL	71
Abb. 24: Nicht-kumulative 2h- Auftragung der erhaltenen Urin-Parameter nach WL.....	72
Abb. 25: Blutdruck-Analyse bei volumenexpandierten Mäusen im Vergleich zu sham-Kontrollen	73
Abb. 26: cGMP-, Aldosteron- und Vasopressin Konzentrationen nach hypotoner Volumenexpansion	75
Abb. 27: Die medulläre ENaC-Plasmamembran-Verteilung	76
Abb. 28: Immunhistochemische Analyse der renalen ENaC-Expression vor und nach WL	77
Abb. 29: Diuretische und natriuretische Antwort auf WL bei gleichzeitiger Amilorid-Applikation ..	78
Abb. 30: Reinheitsanalyse der verwendeten Fraktionen	79
Abb. 31: Immunhistochemische Analyse der Membranverteilung von AQP2.....	80
Abb. 32: Analyse der AQP2-Plasmamembranverteilung	81
Abb. 33: Untersuchung der Ser256-Phosphorylierung PM-ständiger AQP2-Kanäle	82
Abb. 34: Postuliertes Modell der Regulation der Membranlokalisation von AQP2.....	93

H.3 Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Phosphorylierungs-Targets der cGMP-abh. Proteinkinase II.....	9
Tab. 2: Liste der verwendeten Geräte	28
Tab. 3: Liste der verwendeten Chemikalien, Arzneistoffe, Verbrauchsmaterialien und Kits	29
Tab. 4: Verwendete Antikörper	30
Tab. 5: Puffer und Lösungen	31
Tab. 6: Zusammensetzung SDS-Polyacrylamidgele	40
Tab. 7: Zusammensetzung Tricin-SDS-Polyacrylamidgele	40
Tab. 8: Basale metabolische Parameter unter verschiedenen Salz-Diäten	63
Tab. 9: Metabolische Parameter unter Fasten-Bedingungen	64
Tab. 10: Tabellarische Auflistung der nach WL errechneten kumulativen Werte.....	71
Tab. 11: Tabellarische Auflistung der nach der ersten Sammelperiode ermittelten WL-Werte.....	73

H.4 weitere Anhänge

H.4.1 Protokoll zum Gießen von LB-Agarplatten

Zur Herstellung von LB-Medium für Agarplatten wurde eine fertige Mischung verwendet, von welchem pro 1000ml Medium je 25g (10g Tryptone, 5g Hefeextrakt, 10g NaCl) eingewogen wurde. Nach der Zugabe von 15g Agar wurde mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ auf 1l aufgefüllt und bei 121°C autoklaviert. Die Lösung wurde stehen gelassen, bis sie auf ca. 60°C abgekühlt war und im Anschluss sterilfiltrierte Antibiotikallösungen (Endkonz.: CAM: 35µg/ml, Amp: 200µg/ml) zugegeben. Schließlich wurden je ca. 20ml der Lösung in Petrischalen ausgegossen und die Platten nach dem Aushärten bis zur weiteren Verwendung bei 4°C aufbewahrt.

H.4.2 PCR-Protokoll zur Genotypisierung von cGKI-KO-Mäusen

Gewebeproben wurden zunächst mit 75µl 25mM NaOH/0,2mM EDTA für 1h bei 98°C lysiert und anschließend mit 75µl 40mM Tris/HCl (pH = 5,5) neutralisiert. Nach dem Abzentrifugieren von nicht-lysierten Gewebeteilen (4000rpm, 15min) wurde der Überstand in ein neues Cup überführt und 2,5µl für die PCR eingesetzt.

Primer-Sequenzen:

AV3R: 5' - ATT AAG GGC CAG CTC ATT CC - 3'
 E2FB AV: 5' - GGT GAA GTT TTA GGT GAA ACC AAG -3' WT-Fragment: 275bp
 AV9R: 5' - CTG CTT AAT GAC GTA GCT GCC - 3' KO-Fragment: 450bp

PCR-Ansatz:

H₂O		18,35
10x PCR-Buffer		2,5
dNTP	10mM	0,5
Primer AV9R	25pmol/µl	0,3
Primer 118E2FB-AV	50pmol/µl	0,3
Primer AV3R	50pmol/µl	0,3
Taq Polymerase (Sigma)	5U/µl	0,25
DNA		2,5

PCR-Protokoll:

1.	94°C	5min	
2.	94°C	30sec	10x
3.	66°C	30sec	
4.	72°C	1min	
5.	94°C	30sec	27x
6.	59°C	30sec	
7.	72°C	1min	
8.	72°C	10min	
9.	4°C	Pause	

Gradient erste 10 Zyklen: -1°C/Zyklus, Heizdeckel-Temperatur: 105°C

H.4.3 Verkürzte cGKII-DNA und Protein-Sequenz zur Expression in *E. coli* und Generierung eines Antikörpers

Der N-terminale Bereich der GKII wurde ab Aminosäure 4 (Serin) bis Aminosäure 183 (Methionin) kloniert und exprimiert.

```

TCAGTGAAGCCCCAAGCATGCTAAGCA
TCAGTGAAGCCCCAAGCATGCTAAGCA
--S--V--K--P--K--H--A--K--H

481 CCCAGATGGCCATTTCAGGGAACCTCAGCAATGAAGCCCTGCGGAGCAAGGTGTTGGAGCT
   39 CCCAGATGGCCATTTCAGGGAACCTCAGCAATGAAGCCCTGCGGAGCAAGGTGTTGGAGCT
   13 --P--D--G--H--S--G--N--L--S--N--E--A--L--R--S--K--V--L--E--L

541 GGAGCGGGAGCTGAGGAGGAAGGACRCGGAACTTCAGGAACGGGAGTACCACCTGAAGGA
   99 GGAGCGGGAGCTGAGGAGGAAGGACCGGAACTTCAGGAACGGGAGTACCACCTGAAGGA
   33 --E--R--E--L--R--R--K--D--A--E--L--Q--E--R--E--Y--H--L--K--E

601 GCTTCGGGAGCAGCTGGCCAAGCAGACCGTGGCCATCGCAGAGCTCACAGAAAGAACTGCA
   159 GCTTCGGGAGCAGCTGGCCAAGCAGACCGTGGCCATCGCAGAGCTCACAGAAAGAACTGCA
   53 --L--R--E--Q--L--A--K--Q--T--V--A--I--A--E--L--T--E--E--L--Q

661 GAGCAAGTGCATCCAGCTGAACAAGCTGCAGGATGTRGATCCACGTGCAGGGAGGAAGCCC
   219 GAGCAAGTGCATCCAGCTGAACAAGCTGCAGGATGTGATCCACGTGCAGGGAGGAAGCCC
   73 --S--K--C--I--Q--L--N--K--L--Q--D--V--I--H--V--Q--G--G--S--P

721 ACTGCAGGCCCTCTCCCGACAAAAGTGCCCTCTGGATGTTACCGCAAGACCTCAGGCTTGGT
   279 ACTGCAGGCCCTCTCCCGACAAAAGTGCCCTCTGGATGTTACCGCAAGACCTCAGGCTTGGT
   93 --L--Q--A--S--P--D--K--V--P--L--D--V--H--R--K--T--S--G--L--V

781 CTCGCTCCACAGCAGGAGGGGGGCGAAGGCTGGAGTGTCTGCAGAGCCAAACCACCCGAAC
   339 CTCGCTCCACAGCAGGAGGGGGGCGAAGGCTGGAGTGTCTGCAGAGCCAAACCACCCGAAC
   113 --S--L--H--S--R--R--G--A--K--A--G--V--S--A--E--P--T--T--R--T

841 CTATGACCTCAACAAAACCCCGAGTTTTCCTTTGAGAAAGCGAGAGTCAGGAAGGATTTC
   399 CTATGACCTCAACAAAACCCCGAGTTTTCCTTTGAGAAAGCGAGAGTCAGGAAGGATTTC
   133 --Y--D--L--N--K--P--P--E--F--S--F--E--K--A--R--V--R--K--D--S

901 CAGTGAGAAAAAGCTCATCACAGATGCCCTGAATAAGAACCAGTTTCTGAAGAGATTYTGGA
   459 CAGTGAGAAAAAGCTCATCACAGATGCCCTGAATAAGAACCAGTTTCTGAAGAGATTGGA
   153 --S--E--K--K--L--I--T--D--A--L--N--K--N--Q--F--L--K--R--L--D

961 TCCCCAGCAGATCAAGGACATGGTGGAATGCATGTACGGGAGAAAACATCAACAGGGCAG
   519 TCCCCAGCAGATCAAGGACATGGTGGAATGCATGTACGGGAGAAAACATCAACAGGGCAG
   173 --P--Q--Q--I--K--D--M--V--E--C--M

```


H.5 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen Personen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, meinen herzlichen Dank aussprechen.

Zuallererst möchte ich Herrn Prof. Dr. Schlossmann dafür danken, dass ich auch nach meiner Diplomarbeit weiterhin ein Teil seiner Arbeitsgruppe sein durfte, für die Überlassung des Themas, die hervorragende Betreuung, die Bereitstellung der Mittel zur Durchführung sowie das entgegengebrachte Vertrauen. Auch danke ich Herrn Prof. Dr. Kees für die großartige Unterstützung bzgl. der HPLC-Analysen und der Vasopressin-Bestimmungen sowie für seine generelle Hilfsbereitschaft bei allerlei technischen und wissenschaftlichen Fragen. Des Weiteren möchte ich Herrn Prof. Dr. Korbmacher bzw. Herrn Prof. Dr. Castrop für die Überlassung des ENaC-Antikörpers danken.

Auch an unsere Sekretärin Rita sowie unseren TAs Katharina, Astrid und Gertraud ein herzliches „merci“ für die Unterstützung und das hilfsbereite und freundliche Arbeitsumfeld. Ohne Gertraud wäre das Antikörper-Projekt niemals machbar gewesen und Astrids vielfältige Unterstützung u.a. auch bei der Krea-Analyse, den cGMP-ELISAs und v.a. bei den Plasmamembran-Preps der letzten Monate war ohne Gleichen, vielen lieben Dank dafür!

Weiterhin möchte ich Philipp Tauber für die Durchführung des Aldosteron-ELISAs sowie Dr. Katharina Mederle für das Vermitteln Maus-chirurgischer Kenntnisse danken.

Ein herzliches Dankeschön auch an „meine“ Praktikanten Julia, Elena und Max, meine Laborkollegen Lisa, Julia, Franzi, Steffi und Johannes sowie alle ehemaligen Kollegen. Das Gelingen dieser Arbeit wurde durch das einmalige Arbeitsklima stets positiv unterstützt und besonders mit Steffi und Lisa möchte ich auch die ein oder andere nicht-wissenschaftliche Unterhaltung nicht missen; ich bin ihnen inzwischen tief freundschaftlich verbunden. Lisa gebührt außerdem mein Dank fürs Korrekturlesen. Ich freue mich auf eine weitere Zusammenarbeit mit euch allen!

Auch an meinen Freundeskreis ein „Vergelt's Gott“, insbesondere Bibi, Matze, Alex, Christoph und Jürgen, welche mich v.a. in den letzten Wochen und Monaten unterstützt und immer wieder für Ablenkung gesorgt haben.

Schließlich gebührt mein größter Dank meiner Familie, die mir nicht nur mein Studium und damit auch die Promotion ermöglicht, sondern auch nie den Glauben an mich verloren hat. Ich danke euch aus tiefstem Herzen dafür, dass ich immer zu euch kommen kann, ihr jederzeit ein offenes Ohr für mich habt und die Sonne immer wieder aufgeht, wenn ich bei euch bin!

Dankbarkeit ist das Gedächtnis des Herzens.

(Jean-Baptiste Massillon)

H.6 Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe des Literaturzitats gekennzeichnet.

Weitere Personen waren an der inhaltlich-materiellen Herstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich hierfür nicht die entgeltliche Hilfe eines Promotionsberaters oder anderer Personen in Anspruch genommen. Niemand hat von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

.....
(Ort, Datum)

.....
(Unterschrift)